

Untersuchung der Diffusion in dünnen Flüssigkeitsfilmen mit Methoden der Einzelmoleküldetektion

von der Fakultät für Naturwissenschaften
der Technischen Universität Chemnitz
genehmigte

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt
von Dipl.-Phys. Jörg Schuster
geboren am 29. 09. 1969 in Karl-Marx-Stadt

eingereicht am	20. 11. 2001
Gutachter:	Prof. Dr. Christian von Borczyskowski Prof. Dr. Dieter Gerlich Prof. Dr. Thomas Schmidt
Tag der Verteidigung:	07. 01. 2002

Bibliographische Beschreibung

Schuster, Jörg: „Untersuchung der Diffusion in dünnen Flüssigkeitsfilmen mit Methoden der Einzelmoleküldetektion“, Dissertation, Technische Universität Chemnitz, Chemnitz, 2001, 178 Seiten, 72 Abbildungen, 3 Tabellen

Referat

Diese Arbeit beschreibt die Untersuchung der Diffusion in dünnen Flüssigkeitsfilmen auf festen Oberflächen mit Methoden der Einzelmoleküldetektion. Anhand von Computersimulationen wird die Spotgrößenanalyse als neue Methode zur Analyse von Diffusionsprozessen vorgestellt.

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass die Diffusion von Farbstoffen in ultradünnen Flüssigkeitsfilmen stark verlangsamt ist. In einem ca. 3 nm dicken Film aus Tetrakis(2-ethyl-hexoxy)-silan werden Diffusionsprozesse beobachtet, die durch Sprünge zwischen Bereichen mit diskreten Werten der Diffusionskonstante gekennzeichnet sind. Die Existenz diskreter Werte der Diffusionskonstante kann durch die Ausbildung von Flüssigkeitsschichten molekularer Dicke (Liquid Layering) erklärt werden.

Die Spotgrößenanalyse erweist sich als unabhängige Methode zur Bestimmung der Diffusionskonstante diffundierender Moleküle. Gegenüber der etablierten Bestimmung der Diffusionskonstante aus Trajektorien diffundierender Moleküle durch Berechnung der mittleren quadratischen Verschiebung bietet die Spotgrößenanalyse eine höhere statistische Genauigkeit und die Möglichkeit, Änderungen der Diffusionskonstante instantan zu detektieren.

Schlagwörter

Einzelmolekülspektroskopie, Fluoreszenzmikroskopie, Fluoreszenzfarbstoff, Fluoreszenzsonde, Videomikroskopie, konfokale Mikroskopie, Diffusion, Computersimulation, Flüssigkeitsfilm, Benetzung

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	9
2	Experimentelle und theoretische Grundlagen	13
2.1	Benetzung von Oberflächen und Eigenschaften dünner Flüssigkeitsfilme	13
2.1.1	Benetzung von Oberflächen	14
2.1.2	Eigenschaften dünner Flüssigkeitsfilme	22
2.1.3	Diffusion	25
2.2	Detektion einzelner Moleküle	28
2.2.1	Ein kurzer Überblick	28
2.2.2	Photophysik von Fluoreszenzfarbstoffen und Detektionsbedingungen	30
2.3	Grundlagen der optischen Mikroskopie	33
2.3.1	Auflösungsvermögen und Detektionseffizienz	33
2.3.2	Konfokale Mikroskopie	38
2.3.3	Weitfeldmikroskopie	39
2.4	Methoden zur Analyse von Diffusionsprozessen auf der Basis der Einzelmoleküldetektion	44
2.4.1	Korrelationsspektroskopie und Fluoreszenzburstanalyse	44
2.4.2	Single Molecule Tracking	48
3	Computersimulationen zur Analyse von Diffusionsprozessen mittels Videomikroskopie	53
3.1	Fragestellungen	53
3.2	Computersimulationen	54
3.3	Ergebnisse zum Single Molecule Tracking	55

3.4	Spotgrößenanalyse	60
4	Experimentelles	71
4.1	Experimentelle Aufbauten	71
4.1.1	Konfokalmikroskop für die Fluoreszenzburstanalyse	71
4.1.2	Weitfeldmikroskop für die Einzelmolekülvideomikroskopie .	74
4.2	Probenpräparation und -charakterisierung	80
4.2.1	Proben für die Fluoreszenzburstanalyse	80
4.2.2	Präparation von Proben für die Einzelmolekülvideomikro- skopie	82
4.3	Datenanalyse	89
4.3.1	Fluoreszenzburstanalyse	89
4.3.2	Bildbearbeitung	94
4.3.3	Trajektorienanalyse und Analyse der Spotgrößen	98
5	Analyse von Diffusionsprozessen in Flüssigkeitstropfen mittels Fluoreszenzburstanalyse	101
5.1	Vorarbeiten	101
5.2	Ergebnisse und Diskussion	101
5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	105
6	Analyse von Diffusionsprozessen in ultradünnen Flüssigkeitsfil- men mittels Videomikroskopie	107
6.1	Ergebnisse und Diskussion	107
6.1.1	Experimente am Rand benetzender Tropfen	107
6.1.2	Experimente an dünnen TEHOS-Filmen	119
6.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	148
7	Zusammenfassung	151
8	Ausblick	153

Liste der verwendeten Symbole und Abkürzungen

A	...	Spotgröße, Fläche
c	...	Konzentration
γ	...	Grenzflächenspannung
D	...	Diffusionskoeffizient
e	...	Filmdicke
ε	...	dimensionsloses Zeitintervall, Indexabstand
f	...	Kraft/Längeneinheit bzw. Freie Energie/Flächeneinheit
F	...	Freie Energie
G	...	Autokorrelationsfunktion
η	...	Viskosität
H	...	Hamaker-Konstante
Θ	...	Kontaktwinkel
I	...	Intensität
k_{ij}	...	Übergangsraten
L_T	...	Trajektorienlänge
λ	...	Wellenlänge
MSD	...	mittlere quadratische Verschiebung (Mean Square Displacement)
n	...	Brechungsindex
N	...	absolute Häufigkeit
N_T	...	Anzahl der Trajektorien
NA	...	numerische Apertur

OG 514	...	Oregon Green 514 (Farbstoff)
p	...	Wahrscheinlichkeitsdichte
PDMS	...	Polydimethylsiloxan
R6G	...	Rhodamin 6G (Farbstoff)
S	...	Spreadingparameter
SNR	...	Signal/Rausch-Verhältnis (Signal/Noise-Ratio)
SSA	...	Spotgrößenanalyse (Spot Size Analysis)
σ	...	Breite einer Gaußverteilung, Streuung
T	...	Temperatur
T_E	...	Belichtungszeit
TEHOS	...	Tetrakis(2-ethyl-hexoxy)-silan
τ	...	Zeitintervall
τ_B	...	Dauer eines Fluoreszenzbursts
τ_D	...	charakteristische Diffusionszeit
φ	...	Detektionseffizienz
ω_0	...	Radius des konfokalen Spots

Kapitel 1

Einführung

Die Eigenschaften dünner Flüssigkeitsfilme oder mikroskopisch kleiner Tropfen auf festen Substraten sind von wachsendem Interesse für eine Vielzahl technologischer Anwendungen, z.B. bei der Beschichtung von Oberflächen, in der Rheologie oder dem rasch wachsenden Gebiet der Handhabung und Manipulation kleinster Flüssigkeitsmengen für analytische und diagnostische Zwecke. In einer Reihe eindrucksvoller Experimente konnte das Potenzial modernster Technologien zur Manipulation von Flüssigkeiten auf mikro- und mesoskopischen Skalen demonstriert werden [1–8]. Dabei zeigt sich, dass es gerade die geschickte Anwendung grundlegenden physikochemischen Wissens auf neuartige Fragestellungen ist, die die Faszination dieser Experimente ausmacht.

Von Flüssigkeitsfilmen auf sehr glatten Oberflächen, deren Dicke in der Größenordnung molekularer Abmessungen liegt, ist bekannt, dass sie Eigenschaften aufweisen, die sich teilweise drastisch von dem Verhalten, das Flüssigkeiten in makroskopischen Volumina zeigen, unterscheiden [9, 10]. In der Nähe der festen Oberfläche kommt es zur Ausbildung geordneter Strukturen, die von der Bildung von Schichten molekularer Dicke [11–13] bis hin zum völligen Gefrieren der Flüssigkeiten in einer kristallinen Ordnung [14] reichen können. Generell können diese Phänomene auf die Existenz langreichweitiger, oszillierender Wechselwirkungen zwischen den Flüssigkeitsmolekülen und den Atomen der Oberfläche zurückgeführt werden [9, 10].

Als Beispiel soll die Ausbildung von Flüssigkeitsschichten in dünnen Filmen (2 bis 10 nm) von Tetrakis(-2-ethyl-hexoxy)-silan (TEHOS) aufgeführt werden, die bisher nur durch Röntgenbeugungsexperimente [11–13] und Molekulardynamiksimulationen [14] untersucht wurden.

mulationen [15] nachgewiesen werden konnten. Über die Transporteigenschaften der Moleküle in diesen strukturierten Filmen ist bisher nichts bekannt, es ist aber davon auszugehen, dass diese sich ebenfalls deutlich von den Bulk-Eigenschaften der Flüssigkeiten unterscheiden.

Die vielleicht drastischste Manifestation dieses, Liquid Layering genannten, Effekts wird beim Spreiten benetzender Flüssigkeiten auf festen Oberflächen beobachtet. Dabei kommt es zur Ausbildung eines aus Terrassen monomolekularer Dicke bestehenden Precursorfilms, der vor der Ausbreitung des makroskopischen Tropfens die Oberfläche benetzt (Terraced Spreading) [16]. Mit den etablierten thermodynamischen und hydrodynamischen Theorien der Benetzung kann die Entstehung eines solchen Precursorfilms nicht erklärt werden [17]. Verschiedene neue theoretische Modelle, darunter das Stratified Droplet Model von de Gennes versuchen deshalb, mikroskopische Phänomene in eine Theorie der Benetzung zu integrieren [18, 19].

Auch hier findet man wieder eine Situation vor, in der über die molekulare Dynamik in diesen dünnen Flüssigkeitsfilmen wenig bekannt ist. Zwar weiß man, dass die Ausdehnung des Precursorfilm auf makroskopischen Skalen mit einem diffusiven Gesetz beschrieben werden kann [20], es ist aber nichts darüber bekannt, ob die Bewegung der Moleküle in diesem Film tatsächlich rein diffusiv ist. Interpretiert man die experimentellen Ergebnisse in diesem Sinne, dann kann die Ausdehnung des Precursorfilms nur durch einen Diffusionskoeffizienten beschrieben werden, der um ca. eine Größenordnung höher ist, als der Diffusionskoeffizient im Bulk-Material [20]. Man würde also im Precursorfilm eine deutlich erhöhte Beweglichkeit der Moleküle erwarten. Die Untersuchung der molekularen Dynamik in dünnen Flüssigkeitsfilmen ist folglich auch für grundlagenphysikalischen Fragestellungen von hohem Interesse.

Mit der Einzelmoleküldetektion hat sich in den letzten Jahren ein mächtiges Werkzeug zur Untersuchung molekularer Dynamik in verschiedensten Umgebungen entwickelt [21–23]. Einzelne fluoreszierende Moleküle haben sich als hochempfindliche Sonden erwiesen, die sensitiv auf Veränderungen ihrer molekularen Umgebung reagieren. Die Abbildung von einzelnen Molekülen mittels konfokaler Mikroskopie oder Videomikroskopie erlaubt es, viele Phänomene unmittelbar sichtbar zu machen. Dazu gehört z.B. das „Blinken“ einzelner Moleküle [24, 25], die Beobachtung von „Quantensprüngen“ in der Fluoreszenzdynamik [26–28] oder

die direkte Visualisierung der Reptationsbewegung kettenförmiger Moleküle [29]. Damit sind erste Ergebnisse oftmals schon vor einer detaillierten Analyse der experimentellen Daten offensichtlich. Durch die statistische Analyse einer Vielzahl von Einzelmolekülereignissen ist es zudem möglich, den Übergang zwischen dem Verhalten individueller Moleküle und dem Verhalten statistisch relevanter Ensembles von Molekülen zu studieren und somit Rückschlüsse auf den mikroskopischen Ursprung makroskopischer Effekte zu ziehen.

Verschiedene Einzelmolekülmethoden, wie die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie [30], die Fluoreszenzburstanalyse [31] oder das Single Molecule Tracking [32] erlauben eine detaillierte Analyse von Diffusionsprozessen. Mittlerweile finden diese Methoden auch zunehmend Anwendung in den Biowissenschaften, wo sie dazu beitragen konnten, Strukturen und Transportmechanismen in biologischen Systemen aufzuklären [33–37].

Die Methode des Single Molecule Tracking basiert auf der Analyse der aus videomikroskopischen Beobachtungen extrahierten Trajektorien diffundierender Moleküle durch Berechnung der mittleren quadratischen Verschiebung. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits festgestellt, dass in videomikroskopischen Bildern auch eine Verbreiterung der beugungslimitierten Abbilder einzelner Moleküle durch die Diffusionsbewegung der Moleküle während der Belichtung der CCD-Kamera auftritt [38, 39]. Es stellt sich die Frage, inwieweit es möglich ist, aus dieser Diffusionsverbreiterung der Einzelmolekülbilder Informationen über die Diffusionskonstante zu gewinnen.

Damit sind die wesentlichen Fragestellungen, die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegen, identifiziert. Zum einen ist es die Analyse der diffusionsverbreiterten Einzelmolekülbilder und die damit verbundene Frage, inwieweit es möglich ist, aus der Diffusionsverbreiterung Diffusionskonstanten zu berechnen und welche Vorteile gegenüber etablierten Methoden zur Bestimmung der Diffusionskonstante damit verbunden sind. Zum anderen widmet sich die Arbeit der Untersuchung der Diffusion einzelner Moleküle in dünnen Flüssigkeitsfilmen. Damit ist die Frage verbunden, inwieweit es möglich ist, mit Einzelmolekülmethoden Informationen über die Struktur der Flüssigkeitsfilme auf molekularen Skalen zu gewinnen.

Gliederung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliedert sich wie folgt:

- Im 2. Kapitel werden die experimentellen und theoretischen Grundlagen der Detektion einzelner Moleküle beschrieben. Weiterhin sind in diesem Kapitel der Stand der Forschung auf dem Gebiet der Benetzung und des Spreitens von Flüssigkeiten auf Oberflächen sowie die Eigenschaften ultradünner Flüssigkeitsfilme abrisssartig dargestellt.
- Computersimulationen zur Modellierung von Diffusionsprozessen unter Bedingungen der Einzelmolekülvideomikroskopie werden im 3. Kapitel vorgestellt. Diese Computersimulationen erlauben es, die zur Datenanalyse eingesetzten Methoden zu überprüfen sowie Aussagen über die Genauigkeit der ermittelten Ergebnisse zu machen. In diesem Kapitel wird die Spotgrößenanalyse als neue Methode zur Bestimmung von Diffusionskonstanten aus videomikroskopischen Daten vorgestellt.
- Die experimentellen Aufbauten und die Details der Probenpräparation und der Datenanalyse werden im 4. Kapitel behandelt.
- Das 5. Kapitel widmet sich der Untersuchung der Diffusion einzelner Moleküle am Rand partiell benetzender Tropfen unter Anwendung der Fluoreszenzburstanalyse.
- Gegenstand des 6. Kapitels ist die Untersuchung der Diffusion in dünnen Flüssigkeitsfilmen und im Precursorfilm benetzender Tropfen mit Methoden der Einzelmolekülvideomikroskopie.
- Die letzten beiden Kapitel fassen die vorliegenden Ergebnisse zusammen und vermitteln einen Ausblick auf weitere Fragestellungen, die sich aus den hier vorgestellten experimentellen Ergebnissen ergeben.

Kapitel 2

Experimentelle und theoretische Grundlagen

2.1 Benetzung von Oberflächen und Eigenschaften dünner Flüssigkeitsfilme

Phänomene der vollständigen Benetzung beruhen wesentlich auf der Ausbildung monomolekular dünner Flüssigkeitsfilme, die sich vor dem makroskopischen Tropfen auf einer festen Oberfläche ausbreiten. Es ist zu erwarten, dass Struktur und Dynamik dieser Precursorfilme mit der ausgedehnten ultradünnen Flüssigkeitsfilme, die in der vorliegenden Arbeit sehr ausführlich untersucht wurden, vergleichbar sind. Viele Erkenntnisse, die an ausgedehnten ultradünnen Flüssigkeitsfilmen gewonnen wurden, sind deshalb sicherlich auf die Precursorfilme der Benetzung übertragbar und umgekehrt.

Die Ausbildung der Precursorfilme der Benetzung spiegelt in beispielhafter Weise den Einfluß langreichweitiger Wechselwirkungen auf Flüssigkeiten in der Nähe fester Oberflächen wider. Deshalb soll die Theorie der Benetzung hier relativ ausführlich behandelt werden, obwohl Experimente an benetzenden Tropfen nur einen kleinen Teil der in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen Ergebnisse ausmachen. Für das Verständnis dieser experimentellen Ergebnisse ist zudem das Wissen über die Eigenschaften des Precursorfilms eine wesentliche Voraussetzung.

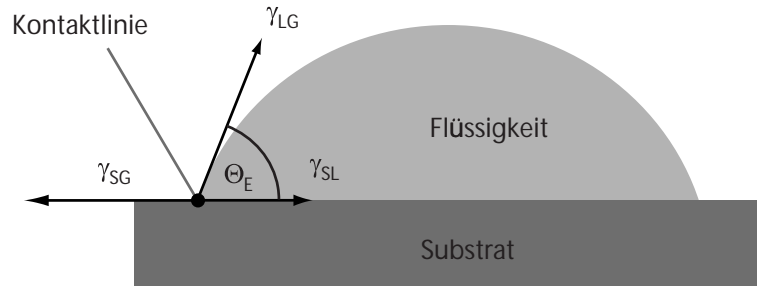


Abbildung 2.1: Youngs Konstruktion zur Berechnung des Gleichgewichtskontaktwinkels.

2.1.1 Benetzung von Oberflächen

Obwohl grundlegende Arbeiten zur Benetzung von flüssigen und festen Oberflächen (Young, Laplace) bereits vom Anfang des 19. Jahrhunderts stammen, wurden wesentliche Fortschritte auf theoretischem wie experimentellem Gebiet erst in den letzten beiden Jahrzehnten, vor allem durch die Arbeiten von de Gennes [18, 40] erreicht. Der wesentliche Erkenntnisfortschritt, der hierbei gewonnen wurde, liegt darin, dass Benetzungsphänomene durch makroskopische Theorien nur unzureichend beschrieben werden, also mikroskopische Phänomene (langreichweitige Wechselwirkungen auf atomaren und molekularen Skalen) berücksichtigt werden müssen, um eine vollständige Beschreibung von Benetzungsprozessen zu erreichen. Bis heute existiert für viele experimentell beobachtete Phänomene noch keine adäquate theoretische Beschreibung.

Die zentrale Größe zur thermodynamischen Beschreibung der Benetzung ist die Oberflächenspannung oder Grenzflächenspannung γ . Sie ist definiert als Ableitung der freien Energie F

$$\gamma = \left. \frac{\partial F}{\partial A} \right|_{T,V} \quad (2.1)$$

nach der Oberfläche A bei konstanter Temperatur T und konstantem Volumen V . Die Oberflächenenergie ist also die freie Energie ∂F , die nötig ist, um die Grenzfläche zwischen zwei Phasen um ∂A zu vergrößern. Stellt man sich die Fläche A als von einer Kurve L (der Kontaktlinie) begrenzt vor, dann kann γ auch als die Kraft interpretiert werden, die nötig ist, um die Kontaktlinie um ∂L zu verlängern. Diese Kraft steht senkrecht auf der Kontaktlinie L und liegt in der Ebene der Oberfläche A . Auf dieser Überlegung basiert Youngs Konstruktion (Abb. 2.1), die den Gleichgewichtskontaktwinkel Θ_E für eine 3-Phasen-Grenzlinie

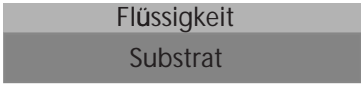



	benetzend	nicht benetzend
total	$S \geq 0$ $\Theta_E = 0$ 	$S < 0$ $\Theta_E = \pi$ 
partiell	$S < 0$ $0 < \Theta_E < \pi/2$ 	$S < 0$ $\pi/2 \leq \Theta_E < \pi$ 

Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der verschiedenen Benetzungsszenarien.

mittels einer Kräftebilanz definiert. Im Beispiel eines flüssigen (L) Tropfens auf einer festen (S) Oberfläche, umgeben von einem gasförmigen (G) Medium ergibt sich:

$$\gamma_{SG} = \gamma_{LG} \cos(\Theta_E) + \gamma_{SL} \quad (2.2)$$

Abhängig vom Kontaktwinkel lassen sich vier verschiedene Benetzungsszenarien (Abb. 2.2) unterscheiden: bei $\pi/2 \leq \Theta_E \leq \pi$ handelt es sich um eine nicht benetzende Flüssigkeit, im Bereich $0 < \Theta_E < \pi/2$ spricht man von partieller Benetzung und für $\Theta_E = 0$ von totaler Benetzung. Während also der Fall partieller Benetzung durch einen endlichen Kontaktwinkel im Gleichgewichtszustand gekennzeichnet ist, ist der Endzustand im Falle vollständiger Benetzung ein ausgedehnter dünner Flüssigkeitsfilm. Im Folgenden wird der Fall vollständiger Benetzung näher betrachtet, da nur bei vollständiger Benetzung ultradünne Flüssigkeitsfilme ausgebildet werden, deren Eigenschaften im Mittelpunkt der in dieser Arbeit beschriebenen experimentellen Arbeiten stehen.

Die Situation vollständiger Benetzung wird durch den Spreading Parameter S , der den energetischen Unterschied zwischen der unbedeckten und der mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckten Oberfläche beschreibt, näher charakterisiert:

$$S = \gamma_{SG} - (\gamma_{SL} + \gamma_{LG}) \quad (2.3)$$

Bei vollständiger Benetzung gilt $S \geq 0$. Da der Spreadingparameter S ein Maß für den Energiegewinn bei der Benetzung ist, sollte man erwarten, dass er einen wesentlichen Einfluss auf die Geschwindigkeit v , mit der sich die Kontaktlinie ausbreitet, hat. Je größer S ist, desto schneller sollte sich die Kontaktlinie ausbreiten. Es wird sich jedoch zeigen, dass die Ausbreitung der Kontaktlinie des makroskopischen Tropfens unabhängig von S erfolgt. Warum ist das so?

Unmittelbar nach der Deposition eines Tropfens auf der Oberfläche befindet sich das System in einem Nichtgleichgewichtszustand, der in diesem Zustand gemessene Kontaktwinkel wird als dynamischer Kontaktwinkel Θ_D bezeichnet. Durch Relaxation der Tropfenform und Bewegung der Kontaktlinie gleicht sich dieser allmählich an Θ_E an. Experimentell zeigt sich nun, dass die Geschwindigkeit v der Kontaktlinie nicht von S abhängt, sondern einem Gesetz [17, 41]

$$v = \frac{\gamma}{\eta} \Theta_D^3 \quad (2.4)$$

folgt, wobei η die Viskosität der Flüssigkeit ist. Für die Zeitentwicklung des Radius R_d des makroskopischen Tropfens mit konstantem Volumen V ergibt sich [17, 42]:

$$R_d(t) = V^{3/10} \left(\frac{\gamma_{LG} t}{\eta} \right)^{1/10} \quad (2.5)$$

Betrachtet man die Bewegung der Kontaktlinie im Rahmen der Theorie von Young, so ergibt sich eine Kraft (pro Längeneinheit) f_D an der Kontaktlinie zu

$$f_D = \gamma_{SG} - (\gamma_{SL} + \gamma_{LG} \cos(\Theta_D)) = S + \gamma_{LG} (1 - \cos(\Theta_D)) \quad (2.6)$$

In der Näherung kleiner Winkel folgt:

$$f_D = S + \frac{1}{2} \gamma_{LG} \Theta_D^2 \quad (2.7)$$

Diese Kraft soll durch die viskose Reibungskraft $f_v = \eta v / \Theta_D$ der an der Kontaktlinie fließenden Flüssigkeit kompensiert werden. Eine genaue Rechnung [40] zeigt aber, dass diese Kraft nur den zweiten Term in Gleichung 2.7 kompensiert, was auf die bereits empirisch begründete Gleichung 2.4 führt. Was kompensiert aber nun den ersten Term in Gleichung 2.7, also die durch S beschriebene Kraft?

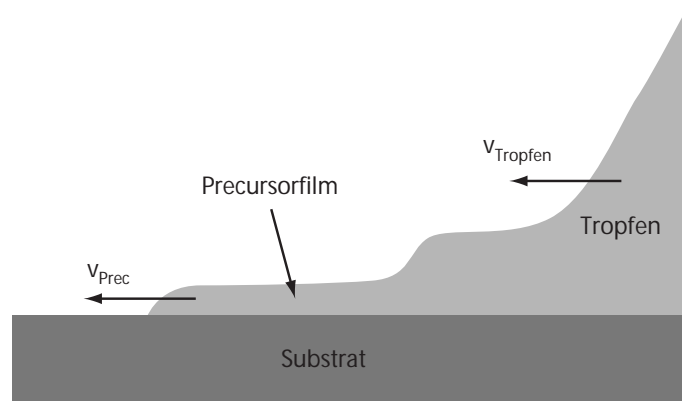


Abbildung 2.3: *Ausbildung des Precursorfilms im Falle vollständiger Benetzung am Rand des makroskopischen Tropfens.*

Hier zeigen sich erstmals die Grenzen der klassischen makroskopischen Theorie, die die Vorgänge bei der Benetzung einer Oberfläche allein durch die Grenzflächenenergien beschreibt. De Gennes [40] konnte zeigen, dass die in der obigen Bilanz überschüssige Kraft exakt durch die viskose Reibung im Precursorfilm kompensiert wird. Der mikroskopisch dünne Precursorfilm (Abbildung 2.3) breitet sich im Falle vollständiger Benetzung auf einem Substrat vom Rand des makroskopischen Tropfens aus und bedeckt das Substrat vor der Ausbreitung des makroskopischen Tropfens. Die Ursache für die Ausbildung des Precursorfilms liegt in der Existenz langreichweitiger Kräfte (van der Waals-Kräfte), die verhindern, dass der Flüssigkeitsfilm am Tropfenrand beliebig dünn werden kann. Vielmehr kann ein ausgedehnter dünner Flüssigkeitsfilm auf einem Substrat nur eine minimale Filmdicke e_0 erreichen. In den Bereichen des Tropfenrandes, wo die Flüssigkeitsfilme sehr dünn werden, müssen also die langreichweitigen Kräfte in die Energiebilanz aufgenommen werden. Die freie Energie pro Flächeneinheit $f(e)$ eines ausgedehnten dünnen Flüssigkeitsfilms der Dicke e lautet dann:

$$f(e) = \gamma_{SL} + \gamma_{LG} + P(e) \quad (2.8)$$

wobei $P(e)$ den Anteil der langreichweitigen Kräfte beschreibt. Im Falle von van der Waals-Wechselwirkungen ergibt sich [17]:

$$P(e) = \frac{H}{12\pi e^2} \quad (2.9)$$

H ist die Hamaker-Konstante, in die im Wesentlichen die dielektrischen Eigenschaften der beteiligten Phasen eingehen. Alternativ wird hier oft der Begriff des Spreitungsdrucks (Disjoining Pressure) Π_d benutzt:

$$\Pi_d = -\frac{\partial P}{\partial e} = \frac{H}{6\pi e^3} \quad (2.10)$$

Da H im Falle vollständiger Benetzung positiv ist, bewirkt der Spreitungsdruck ein Anwachsen der Dicke des Flüssigkeitsfilms, während die Grenzflächenenergien eine Verringerung der Dicke bewirken. Als Endstadium der vollständigen Benetzung entsteht also ein ausgedehnter dünner Film mit einer Gleichgewichtsdicke e_0 , dessen Dicke an den Rändern nahezu sprunghaft auf Null sinkt. In der Literatur wird dieser Zustand als Pancake (Pfannkuchen) bezeichnet. Die minimale Dicke ergibt sich zu [17, 40]:

$$e_0 = \left(\frac{H}{4\pi S} \right)^{1/2} \quad (2.11)$$

Da dies die minimale Dicke für einen Gleichgewichtsfilm auf einer festen Oberfläche ist, kann auch der Rand eines benetzenden Tropfens nicht dünner als e_0 werden. Der Spreitungsdruck treibt also die Ausbildung des Precursorfilms am Rand eines benetzenden Tropfens an. Die Ausbreitung und die Dicke des Precursorfilms ist nun in starkem Maße vom Spreadingparameter S abhängig. Generell lässt sich sagen, dass der Precursor-Film um so ausgedehnter und dünner ist, je größer S wird. Für die exakten Abhängigkeiten existieren je nach Modell unterschiedliche Aussagen, insbesondere der Übergangsbereich zwischen Precursorfilm und makroskopischem Tropfen ist theoretisch noch nicht vollständig beschrieben [17]. Die Ausbreitung des Precursorfilms erfolgt wesentlich schneller, als sich die makroskopische Kontaktlinie ausbreitet. Ebenso ist die Ausdehnung R_p des Precursorfilms wesentlich größer als der Radius R_d des makroskopischen Tropfens. Die Zeitentwicklung $R_p(t)$ folgt [17]:

$$R_p(t) \sim t^{1/2} \quad (2.12)$$

Diese Zeitentwicklung deutet auf ein diffusives Wachstum des Precursorfilms hin. Tatsächlich ist aber nicht klar, ob die Bewegung der Moleküle im Precursorfilm rein diffusiv ist. Detaillierte Diskussionen der verschiedenen Modelle finden sich u.A. in [17, 40].

Auf hochenergetischen Oberflächen mit hohen Werten von S kann die minimale Filmdicke in den Bereich molekularer Dimensionen kommen. Damit gelangt wiederum auch die Kontinuumstheorie des Spreitungsdrucks an ihre Grenzen. Derzeit existieren aber noch keine Theorien, die die molekulare Natur der langreichweitigen Wechselwirkungen berücksichtigen. Es existieren lediglich Modelle von Burlatsky [19] sowie von de Gennes und Cazabat [18], die jedoch noch nicht in vollem Umfang bestätigt sind und zum Teil auch widersprüchliche Vorhersagen liefern. Das Burlatsky-Modell basiert auf einer Flüssigkeit aus harten Kugeln, wobei der makroskopische Tropfen lediglich als Teilchenreservoir dient. In diesem Modell findet kein Fluss von Teilchen aus dem Tropfen in den Precursorfilm statt. Vielmehr beruht die Ausbreitung des Precursorfilms auf der Diffusion von Fehlstellen vom Rand des Precursorfilms (geringe Dichte) zum Tropfenrand, wo die Fehlstellen aus dem Reservoir aufgefüllt werden. Das hydrodynamische Modell von de Gennes und Cazabat (Stratified Droplet Model) schlägt ein System zweidimensionaler inkompressibler Flüssigkeitsschichten von molekularer Dicke und makroskopischer Ausdehnung vor. Moleküle können zwischen den Schichten ausgetauscht werden, wobei der Austausch von oberen nach unteren Flüssigkeitsschichten bevorzugt ist und nur in der Nähe der Tropfenoberfläche erfolgt. Weiterhin wird in diesem Modell eine viskose Reibung eingeführt, die unterschiedliche Werte zwischen den Flüssigkeitsschichten und für die erste unmittelbar auf der festen Oberfläche befindlichen Flüssigkeitsschicht aufweist. Beide Modelle reproduzieren Gleichung 2.12 und den experimentellen Befund, dass offenbar ein optimaler Wert der Oberflächenenergie existiert, bei dem die Ausbreitung des Precursorfilms mit maximaler Geschwindigkeit abläuft [43, 44]. Das Modell von de Gennes hat den Vorteil, dass viskose Reibung als wesentlicher Parameter, der die Ausbreitung des Precursorlayers beeinflusst, auf sehr anschauliche Weise eingeführt wird.

Seitdem die Existenz des Precursorlayers 1919 von Hardy durch die Beobachtung von Staubeilchen auf einem benetzten Substrat indirekt nachgewiesen wurde [45], wurden in einer Reihe von experimentellen Arbeiten die Zeitentwicklung von Tropfenprofilen im mikroskopischen Bereich verfolgt [16, 20, 41, 43, 46–53]. Die Untersuchungen wurden meist mit ellipsometrischen Methoden an Silikonölen (Polydimethylsiloxan - PDMS) auf Silizium-Wafern mit unterschiedlichen Oberflächenbehandlungen durchgeführt, womit ein weiterer Bereich von Oberflä-

chenenergien bzw. Spreading-Parametern abgedeckt werden kann. Experimentell etabliert ist, dass die Ausdehnung L des Precursorlayers immer Gleichung 2.12 folgt, wobei der Vorfaktor abhängig von S ist [43, 46, 49, 52]. Einige Autoren können definierte molekulare Wechselwirkungen in Zusammenhang mit der Ausbreitungsgeschwindigkeit des Precursorlayers bringen. So wurde von Valignat et al. [49] gezeigt, dass temporäre Attachments von PDMS-Monomeren an Silanolgruppen der Silizium-Oberfläche die Ausbreitung des Precursorlayers verlangsamen. Durch Variation der relativen Luftfeuchtigkeit konnten in [49, 52] die viskose Reibung zwischen den Molekülen des Precursorlayers und der Oberfläche und somit die Benetzungsgeschwindigkeit variiert werden. In weiteren Experimenten [48] konnte durch geringfügige Variation der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche das Benetzungsverhalten der Oberfläche drastisch verändert werden.

Bei Benetzungsexperimenten von Silizium mit Tetrakis(2-ethyl-hexoxy)-silane (TEHOS) [16, 52] oder PDMS [20] wurden Multilayer-Strukturen des Precursorfilms mit makroskopisch ausgedehnten Terrassen molekularer Dicke beobachtet¹ (Abb. 2.4). Terrassenförmige Strukturen des Precursorfilms wurden auch bei der Untersuchung der Benetzung von Flüssigkristallen auf Silizium mit AFM-Techniken beobachtet [53]. Weiterhin wird vor allem in den Endstadien des Benetzungsprozesses der Übergang des Randes des Precursorfilms in ein molekulares Gas beobachtet, d.h. es werden Submonolagen-Bedeckungen gemessen [43, 50, 51, 54]. Da die Auflösung der verwendeten experimentellen Techniken auf makroskopische Abmessungen (mm) beschränkt ist, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass es am Rand des Precursorlayers zum Aufreißen des Flüssigkeitsfilms, verbunden mit der Ausbildung von insel- oder fingerartiger Strukturen, kommt.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Molekulardynamiksimulationen zur Modellierung der Ausbildung des Precursorfilms durchgeführt, denen wesentliche Erkenntnisse zu verdanken sind [43, 46, 55–57]. In [43] konnten z.B. Zusammenhänge zwischen der Flüssigkeitsstruktur im Precursorfilm und experimentellen Situationen unterschiedlicher Oberflächenenergie, die zu unterschiedlicher Ausbreitungsgeschwindigkeit des Precursorfilm führen, aufgezeigt werden. Die Flüssigkeitsströme in simulierten Tropfen [55, 58, 59] zeigen das Verhalten, das

¹In der Tat hat das Experiment von Heslot [16] das Modell von de Gennes und Cazabat [18] inspiriert.

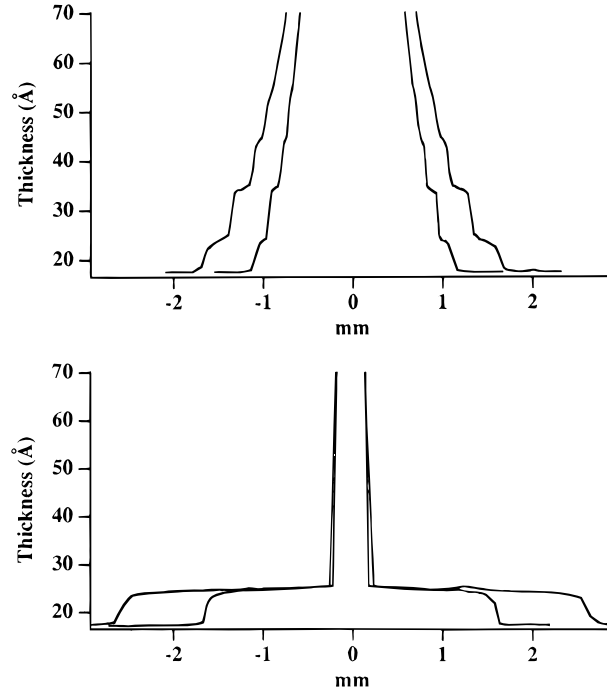


Abbildung 2.4: Tropfenprofile, aufgenommen mit orts aufgelöster Ellipsometrie. Oben: Ausbildung eines terrassenförmigen Precursorfilms (TEHOS auf Si, niedrige relative Luftfeuchte). Unten: Ausbildung eines aus nur einer Monolage bestehenden Precursorfilms (gleiches System, hohe relative Luftfeuchte). Abbildungen aus Vilette et al. [52].

de Gennes in seinem Modell [18] postuliert hat, also eine Beschränkung des Austauschs zwischen den Flüssigkeitsschichten auf den Randbereich des Tropfens und den Übergangsbereich zum Precursorfilm. In [57, 59] konnte auch der Einfluss der molekularen Reibung zwischen der untersten Flüssigkeitsschicht und der Oberfläche analysiert und als der die Benetzungsgeschwindigkeit bestimmende Faktor identifiziert werden. Entscheidend dafür ist die Stärke der Wechselwirkung zwischen den Atomen der Oberfläche und den Molekülen der Flüssigkeit, was in [59] sowohl experimentell als auch in der Simulation demonstriert werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich der derzeitige Erkenntnisstand folgendermaßen beschreiben: Die Dynamik des Benetzungsprozesses entsteht aus dem Wechselspiel zwischen den treibenden Kräften (Kapillarkräfte bzw. Oberflächenspannungen und langreichweitige molekulare Wechselwirkungen) und der Dissipation von Energie durch viskose Reibung auf makroskopischer wie molekularer Skala. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Precursorlayers wird durch Dissipationsprozes-

se auf molekularer Skala bestimmt, die durch die zwischen Flüssigkeitsfilm und Oberfläche wirkenden Kräfte vermittelt wird. Die Dynamik des makroskopischen Tropfens folgt den Gesetzen der Hydrodynamik, als dissipativer Mechanismus wirkt hier die Bulkviskosität η der Flüssigkeit [59]. Entsprechend sind auch die Transportmechanismen im makroskopischen Tropfen überwiegend hydrodynamische Ströme, während man davon ausgeht, dass in den dünnen Precursorfilmen überwiegend diffusiver Transport stattfindet [59].

Die hier beschriebenen Experimente messen makroskopische Größen, insbesondere Tropfenprofile. Obwohl daraus teilweise mikroskopische Bilder [49, 52] entwickelt werden, handelt es sich dabei doch nur um Modelle. Lediglich Molekulardynamiksimulationen erlauben bisher einen Einblick ins Innere der Flüssigkeit und eine direkte Analyse der molekularen Bewegung auf der Ebene einzelner Atome oder Moleküle. Gerade diese molekularen Details, also Reibung auf molekularer Skala, Mobilität der Moleküle oder temporäre Bindungen an die Oberfläche beeinflussen aber das Benetzungsverhalten wesentlich und machen Vorhersagen des Benetzungsverhaltens auf Grund von makroskopischen Parametern (S, γ) oftmals nicht möglich.

2.1.2 Eigenschaften dünner Flüssigkeitsfilme

Die Eigenschaften dünner Flüssigkeitsfilme auf festen Oberflächen sind von enormer Bedeutung für viele technologisch relevante Prozesse, z.B. für die Rheologie [10, 60, 61] oder das rasch wachsende Gebiet der Manipulation kleinster Flüssigkeitsmengen für analytische oder diagnostische Zwecke [2, 3, 62, 63]. Von sehr dünnen Flüssigkeitsfilmen, deren Dicke sich im Bereich einiger Monolagen befindet, ist bekannt, dass sich die Struktur der Flüssigkeit in den Flüssigkeitsfilmen drastisch von der Struktur der Flüssigkeit in makroskopischen Dimensionen unterscheidet. Man findet in diesen Filmen oftmals eine ausgeprägte Ordnung der Moleküle, die der Struktur eines kristallinen Festkörpers ähnlich ist [14]. Diese Strukturänderung kann die physikalischen Eigenschaften der Flüssigkeit drastisch verändern [9, 14, 64, 65].

Molekulardynamiksimulationen von ultradünnen Flüssigkeitsfilmen zwischen zwei festen Oberflächen zeigen beispielsweise Änderungen der Diffusionskonstante von Molekülen im Flüssigkeitsfilm um mehr als zwei Größenordnungen in Abhängigkeit vom Abstand der festen Oberflächen. Für Abstände die im Bereich weni-

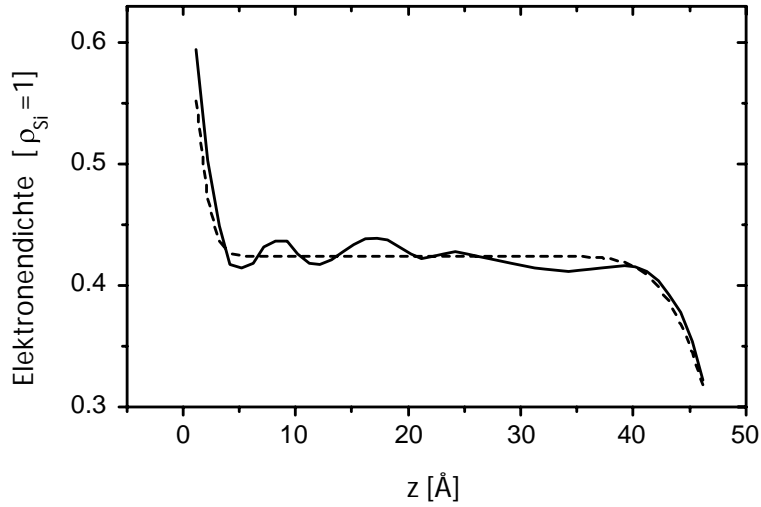


Abbildung 2.5: Elektronendichteverteilung senkrecht zur Oberfläche an einem 4,9 nm dicken TEHOS-Film auf Silizium (Abbildung aus Yu et al. [11]).

ger Moleküldurchmesser liegen, kommt es zum völligen Einfrieren der molekularen Bewegung [66]. Der größte Teil der experimentellen Arbeiten zur Untersuchung ultradünner Flüssigkeitsfilme widmet sich derartigen, zwischen zwei festen Grenzflächen eingeschlossenen, Filmen. Als experimentelles Werkzeug kommt dabei meist der Surface Force Apparatus zum Einsatz.

Zur Untersuchung ultradünner Flüssigkeitsfilme, die von nur einer festen Oberfläche begrenzt sind, existieren dagegen nur wenige experimentelle Arbeiten. In einem Röntgenreflektionsexperiment [11] konnte erstmals die Veränderung der Flüssigkeitsstruktur in dünnen TEHOS-Filmen auf Silizium-Oberflächen direkt nachgewiesen werden. Aus den Röntgenreflexionsdaten konnte die Elektronendichte im Flüssigkeitsfilm in Abhängigkeit von der Entfernung zur Silizium-Oberfläche berechnet werden. Diese weist deutliche Oszillationen senkrecht zur Substratoberfläche auf (Abb. 2.5). Die Flüssigkeit bildet also offenbar wohldefinierte Schichten aus, deren Abstand etwa dem Durchmesser eines Moleküls entspricht. Während in der Ebene dieser Flüssigkeiten die Struktur unverändert flüssigkeitsartig ist, existiert eine ausgeprägte, nahezu kristalline Ordnung, senkrecht dazu. Dieses, Molecular Layering genannte, Phänomen wurde ebenso an dünnen PDMS-Filmen beobachtet [12] und es ist davon auszugehen, dass wohl die meisten Flüssigkeiten auf atomar glatten Oberflächen derartige Effekte zeigen.

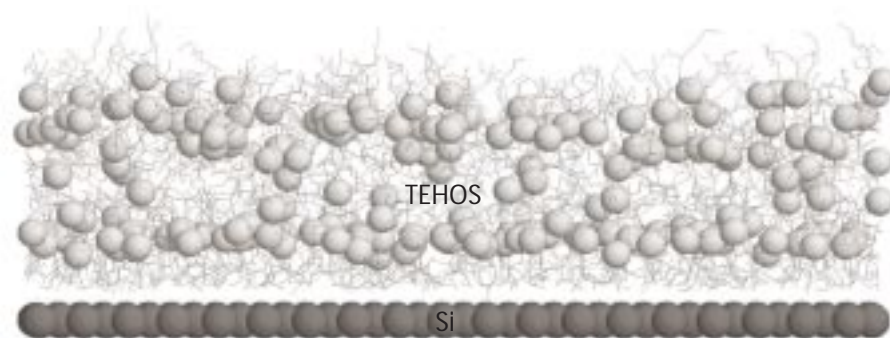


Abbildung 2.6: *Moleküllkonfiguration aus einer Molekulardynamik-Simulation eines ca. 2 nm dünnen TEHOS-Films auf Silizium [15]. Dargestellt sind die Positionen der Si-Atome (Kugeln) und der Kohlenwasserstoffketten (dünne Striche).*

Die experimentellen Ergebnisse an TEHOS und PDMS können auch in Molekulardynamiksimulationen reproduziert werden [15, 46, 55–57]. Abbildung 2.6 zeigt einen Schnappschuss der Moleküllkonfiguration aus einer Molekulardynamiksimulation [15] eines 2 nm dicken TEHOS-Films auf einer Silizium-Oberfläche. Die Schichtstruktur der Moleküle ist deutlich zu erkennen. Ebenso beobachtet man eine solche Schichtstruktur der Flüssigkeiten bei der Ausbildung von terrassenförmigen Precursorfilmen bei der Benetzung [16, 52] oder beim Verdampfen von dünnen Flüssigkeitsfilmen auf Oberflächen [13]. Eine Veränderung der Flüssigkeitsstruktur wird nicht nur in ultradünnen, sondern auch in makroskopisch dicken Flüssigkeitsfilmen in unmittelbarer Nähe der Oberfläche beobachtet [67, 68].

Diese Veränderung der Flüssigkeitsstruktur ist das Ergebnis der Wechselwirkung der Moleküle der Flüssigkeit mit den Atomen (oder Molekülen) der Oberfläche. Relativ langreichweitige, oszillierende Wechselwirkungskräfte prägen der Flüssigkeit eine Struktur auf, die erst in einer Entfernung, die deutlich größer ist als molekulare Abmessungen, verloren geht. Es ist offensichtlich, dass diese Wechselwirkungen auch den molekularen Transport bzw. die molekulare Beweglichkeit in dünnen Flüssigkeitsfilmen sowohl lateral, als auch senkrecht zur Oberfläche beeinflussen sollten.

Eine ähnliches Phänomen, bei dem offenbar Einflüsse der Grenzflächen eine wesentliche Rolle spielen, wird bei der Untersuchung des Glasübergangs an dünnen Polymerfilmen beobachtet. Sowohl für freistehende als auch für auf einer festen Oberfläche befindliche Polymerfilme beobachtet man eine deutliche Ver-

ringerung der Glasübergangstemperatur, sobald die Dicke der Filme kleiner als 80 nm wird [69]. In diesem Fall konnten Einzelmoleküluntersuchungen bereits zeigen, dass in solchen Systemen nahe am Glasübergang eine starke räumliche Heterogenität der molekularen Dynamik auftritt, die mit polarisationsaufgelöster Fluoreszenzdetektion nachgewiesen wurde [70].

2.1.3 Diffusion

Die Thermodynamik beschreibt Diffusion als einen Fluss von Teilchen infolge eines Konzentrationsgradienten, der schließlich zum Ausgleich von Konzentrationsunterschieden in einer Lösung führt. Zugrunde liegt der Diffusion jedoch eine Zufallsbewegung von Teilchen, die durch eine stochastische Kraft, z.B. die thermische Bewegung anderer Teilchen, angetrieben wird. Der Ausgleich von Konzentrationsunterschieden ist also letztlich das Ergebnis vieler unabhängiger Zufallspfade der einzelnen Moleküle in der Flüssigkeit.

Betrachtet man solch einen Zufallspfad (Random Walk), bei dem ein Teilchen in einem Zeitintervall τ zufällige und unabhängige Schritte der Länge $\pm d$ in jede der Richtungen des n_D -dimensionalen Raums zurücklegt, findet man für die Wahrscheinlichkeit, dass ein Teilchen nach einer Zeit $t \gg \tau$ die Entfernung x vom Ursprung ($x = 0$ zur Zeit $t = 0$) zurückgelegt hat, die Wahrscheinlichkeitsdichte

$$p(x, t) = (\tau/2\pi d^2 t)^{n_D/2} \exp\left(\frac{-x^2 \tau}{2td^2}\right) \quad (2.13)$$

(Abb 2.7). Die im folgenden beschriebenen Zusammenhänge gelten streng genommen nur im Limes $t \rightarrow \infty$. Der Übersichtlichkeit halber wird hier die Dimensionalität n_D des Problems mit angegeben. Für $n_D > 1$ ist x dann der Betrag des Vektors \underline{x} .

Die Lösungen der makroskopischen Diffusionsgleichung (2. Ficksches Gesetz) für die Teilchenkonzentration c

$$\frac{\partial c(\underline{x}, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(\underline{x}, t)}{\partial^2 x} \quad (2.14)$$

haben ebenfalls die Form

$$c(x, t) = \frac{c_0}{(4\pi Dt)^{n_D/2}} \exp\left(\frac{-x^2}{4Dt}\right) \quad (2.15)$$

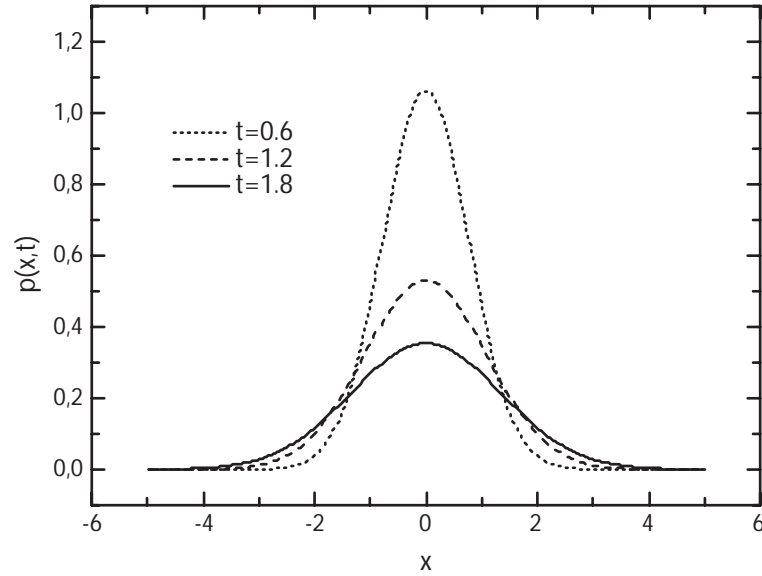


Abbildung 2.7: Zeitentwicklung der Wahrscheinlichkeitsdichte nach Gleichung 2.13.

Dabei wird vorausgesetzt, dass die diffundierenden Teilchen zum Zeitpunkt $t = 0$ am Ort $x = 0$ konzentriert sind. Damit ist es möglich, durch Vergleich der Gleichungen 2.13 und 2.15 die mikroskopischen Größen τ , d mit dem makroskopischen Diffusionskoeffizienten D zu verbinden (Einstein-Smoluchowski-Gleichung):

$$D = \frac{d^2}{2\tau} \quad (2.16)$$

Um Diffusionsprozesse zu beschreiben, betrachtet man meist die mittlere quadratische Entfernung (Mean Square Displacement - MSD), die das Teilchen zurückgelegt hat:

$$\langle x(t)^2 \rangle = n_D d^2 \frac{t}{\tau} = 2n_D D t \quad (2.17)$$

welche linear mit der Zeit wächst.

Für die Diffusion kugelförmiger Moleküle mit dem Durchmesser a , die in unendlicher Verdünnung in einer Flüssigkeit mit der Viskosität η vorliegen, lässt sich die Diffusionskonstante näherungsweise aus der Stokes-Einstein-Beziehung berechnen:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (2.18)$$

Diese Beziehung ergibt sich aus der Balance zwischen der thermisch getriebenen Diffusion und der Reibung in der Flüssigkeit.

Neben dem oben beschriebenen Fall eines Random Walk, bei dem die einzelnen Schritte unkorreliert sind (Markov-Prozess), sind auch andere stochastische Prozesse möglich, bei denen z. B. die einzelnen Schritte korreliert sind oder vor jedem Schritt eine zufällige Wartezeit liegt. Für solche Diffusionsprozesse kann es zu Abweichungen von der linearen Zeitabhängigkeit des MSD kommen. Zur Beschreibung derartiger, anomaler Diffusionsprozesse kann wiederum ein Diffusionskoeffizient definiert werden, wenn das MSD proportional zu einer Potenz der Zeit ist:

$$\langle x(t)^2 \rangle = 2n_D D_\beta t^\beta \quad (2.19)$$

Für $\beta = 1$ erhält man den oben beschriebenen Fall normaler Diffusion, für $\beta < 1$ ($\beta > 1$) spricht man von subdiffusivem (hyperdiffusivem) Verhalten.

Etablierte experimentelle Methoden zur Messung von Diffusionskoeffizienten in Flüssigkeiten beruhen darauf, dass Konzentrationsgradienten einer bestimmten Komponente erzeugt werden und die zeitliche Entwicklung des räumlichen Konzentrationsprofils verfolgt wird. Eine verbreitete Methode ist zum Beispiel FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching), bei der die Diffusion von Fluoreszenzfarbstoffen oder von farbstoffmarkierten Molekülen gemessen wird, indem durch intensive Laserbestrahlung in einem Bereich der Probe die Farbstoffe ausgebleicht werden (Photobleaching) und die Wiederbevölkerung dieses Probenbereiches mit fluoreszierenden Molekülen durch einen abgeschwächten Laserstrahl verfolgt wird. In ähnlicher Weise wird beim Forced Rayleigh Scattering durch Photobleaching ein Interferenzmuster in der Probe erzeugt, aus dessen Relaxation sich wiederum Diffusionskoeffizienten bestimmen lassen.

Weitere Methoden wie NMR-Gradiententechniken nutzen atomare und molekulare Relaxationsprozesse, wie z.B. den Zerfall von Spinechos zur Analyse von Diffusionsprozessen. Methoden der Röntgen- und Neutronenbeugung erlauben ebenfalls die Untersuchung von Diffusionsprozessen. Die letztgenannten Methoden haben durchaus das Potenzial, Bewegungen auf atomaren und molekularen Skalen zu erfassen. Alle hier genannten Methoden haben jedoch gemeinsam, dass für die Erzeugung hinreichend starker Signale eine Mittelung über große Ensembles von Atomen oder Molekülen nötig ist, so dass Heterogenitäten der Ensembles und lokale Informationen oftmals verloren gehen.

2.2 Detektion einzelner Moleküle

2.2.1 Ein kurzer Überblick

Seit es vor mehr als 10 Jahren erstmals gelungen ist, das Fluoreszenzsignal einzelner Moleküle in Festkörpern [71, 72] und Flüssigkeiten [73, 74] nachzuweisen, hat sich die Einzelmolekülspektroskopie und -mikroskopie zu einem eigenständigen Forschungszweig entwickelt. Während zunächst nur wenige Systeme (Fluoreszenzfarbstoff/Umgebungsmatrix) der Einzelmoleküldetektion zugänglich waren, hat vor allem die Entwicklung kompakter hochempfindlicher und robuster Photodetektoren auf Halbleiterbasis (Avalanche Photodioden, backilluminated CCD-Kameras), aber auch die Entstehung immer neuer Ideen und Methoden, dazu geführt, dass die Zahl der der Einzelmoleküldetektion zugänglichen Systeme kaum noch zu überschauen ist.

Neben den bekannten Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Rhodamine u.Ä.) können mittlerweile schwach lumineszierende Biomoleküle (Lichtsammelkomplexe) [75] ebenso wie Farbzentren in Festkörpern [76] oder Halbleiternanopartikel [77–79] als Einzelteilchen nachgewiesen werden.

Einzelteilchenuntersuchungen führten zu völlig neuartigen Ergebnissen, die mit Experimenten an großen Ensembles von Molekülen prinzipiell nicht zugänglich sind. An einzelnen Molekülen und Farbzentren konnten eine Reihe von quantenphysikalischen Effekten unmittelbar beobachtet werden. Ebenso erlaubt es die Beobachtung der Diffusion einzelner Moleküle, die auch in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird, erstmals, Details der Diffusionsbewegung sichtbar zu machen, die herkömmlichen Ensembleexperimenten verborgen bleiben [35].

Im Jahr 1987 gelang es, die Fluoreszenz einzelner Proteine in einem Flüssigkeitsstrom nachzuweisen [73]. Allerdings entsprach die Fluoreszenz dieser Proteine etwa der von 25 Molekülen eines Rhodaminfarbstoffs. Einzelne Moleküle des Farbstoffs Rhodamin 6G konnten erstmals 1990 detektiert werden [74]. In diesem Experiment wurden die Fluoreszenzblitze (Bursts) nachgewiesen, die entstehen, wenn ein Farbstoffmolekül durch den Fokus eines konfokalen Mikroskops diffundiert.

Nahezu gleichzeitig (1989) wurden erste Experimente zur Detektion einzelner Moleküle in mit Farbstoffen dotierten Molekülkristallen durchgeführt [71]. Der erste zweifelsfreie Nachweis der Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls in einem

Festkörper gelang 1990 [72]. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der spektralen Selektion erlaubt es, die bei tiefen Temperaturen (l-He) sehr schmalen und durch die individuellen Einbaulagen der Moleküle im Kristall spektral verschobenen Absorptionslinien mit Hilfe eines schmalbandigen durchstimmbaren Lasers anzuregen. Damit ist es möglich, einzelne Moleküle im Kristall ohne räumliche Auflösung direkt zu adressieren. Obwohl diese Methode experimentell sehr aufwändig und auf sehr spezielle Systeme und tiefe Temperaturen limitiert ist, gelangen in den folgenden Jahren mittels spektraler Selektion einzelner Moleküle eine Reihe eindrucksvoller Experimente: der Nachweis spektraler Diffusion [80], die Beobachtung von Photonenbunching (Bündelung) [27] und Photonenantibunching [26] in der Emission einzelner Moleküle, optisch detektierte magnetische Resonanz an einzelnen Molekülen [81, 82] sowie die direkte Beobachtung von Quantensprüngen einzelner Moleküle [28].

Verzichtet man auf die spektrale Selektion, ist es erforderlich, einzelne Moleküle räumlich zu isolieren. Diese Bedingungen können mit optisch hochauflösenden mikroskopischen Methoden (Konfokalmikroskopie, Nahfeldmikroskopie) realisiert werden. Mittels optischer Nahfeldmikroskopie konnten 1993 erstmals einzelne Moleküle auf Oberflächen bei Raumtemperatur abgebildet werden [83]. In einer Reihe experimenteller Arbeiten konnten hier Einflüsse der Nahfeldsonde auf die Emission der Moleküle [84, 85] ebenso studiert werden, wie langsame Diffusionsprozesse einzelner Moleküle in weichen Umgebungen (z.B. Polymere) [86].

In der Folgezeit wurde schnell klar, dass auch beugungslimitierte optische Techniken (Fernfeldmikroskopien), die experimentell wesentlich leichter zu handhaben sind als die Nahfeldmikroskopie, zur Detektion einzelner Moleküle geeignet sind [87–90]. Damit war es schließlich möglich, dass sich die Einzelmoleküldetektion zu einer etablierten Methode entwickeln konnte, die mittlerweile in einer Reihe von Labors genutzt wird [21–23].

Neben der konfokalen Mikroskopie hat sich mit der Videomikroskopie (Weitfeldabbildung auf eine CCD-Kamera) an einzelnen Molekülen eine weitere Fernfeldmikroskopietechnik zur Detektion einzelner Moleküle entwickelt [32]. Um den Nachteil der gegenüber der konfokalen Mikroskopie verringerten axialen Auflösung (die u. A. zu einer erhöhten Untergrundlumineszenz führt) zu kompensieren, benutzt man hier meist die optische Anregung mittels Totalreflexion, bei der nur eine sehr dünne Schicht der Probe durch das evaneszente Feld an der Oberfläche

eines Prismas beleuchtet wird [91]. Die Möglichkeit, mittels Videomikroskopie in schneller Folge (Bildraten bis zu einigen Hundert Hz) Bilder aufnehmen zu können, macht diese Methode besonders für die Beobachtung sich bewegender einzelner Moleküle interessant (Single Molecule Tracking). So konnte die Diffusion einzelner Moleküle in Phospholipidmembranen [32, 35, 38, 92–94] und in lebenden Zellen [36], die Diffusion von Farbstoffen in Flüssigkeiten [95], in Gelen [96] oder die Bewegung farbstoffmarkierter molekularer Motoren (Kinesin) entlang von Microtubuli [91] beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wird die Einzelmolekülvideomikroskopie auf die Untersuchung der Diffusion einzelner Farbstoffmoleküle in dünnen Flüssigkeitsfilmen an fest/flüssig Grenzflächen angewandt.

Neben Fluoreszenzanregungstechniken können auch Techniken wie Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) zum Nachweis einzelner Moleküle genutzt werden [97]. Mittlerweile erlauben es fortgeschrittene experimentelle Aufbauten auch, mehrere Parameter der Einzelmolekülfluoreszenz (Wellenlänge, Polarisationszustand, Lebensdauer) gleichzeitig zu messen. Mittels Videomikroskopie können beispielsweise in bis zu vier Teilbildern auf einer Kamera Polarisationszustand und Wellenlängenbereich eines Moleküls simultan erfasst werden [98].

Abschließend soll darauf hingewiesen werden, dass zur Detektion von Einzelmolekülen und einzelnen Quantensystemen mittlerweile einige gute Übersichtsarbeiten existieren [21–23, 99].

2.2.2 Photophysik von Fluoreszenzfarbstoffen und Detektionsbedingungen

Um die Photophysik der meisten Farbstoffmoleküle zu beschreiben, genügt eine vereinfachte Darstellung des Energieniveauschemas, die lediglich den Grundzustand 1S_0 , den ersten angeregten Zustand 1S_1 des Singulettsystems und den ersten angeregten Zustand 3T_1 des Triplettsystems berücksichtigt. Höhere Anregungen sowie die Schwingungsstruktur der einzelnen Zustände (die u. A. für die endliche Breite der Absorptions- bzw. Fluoreszenzlinien verantwortlich ist) können für die folgenden Überlegungen vernachlässigt werden, da Anregungen in höhere Schwingungs- und Rotationszustände durch interne Konversion (Internal Conversion - IC) und die Ankopplung an ein thermisches Reservoir sehr schnell in die Schwingungsgrundzustände der elektronischen Niveaus relaxieren.

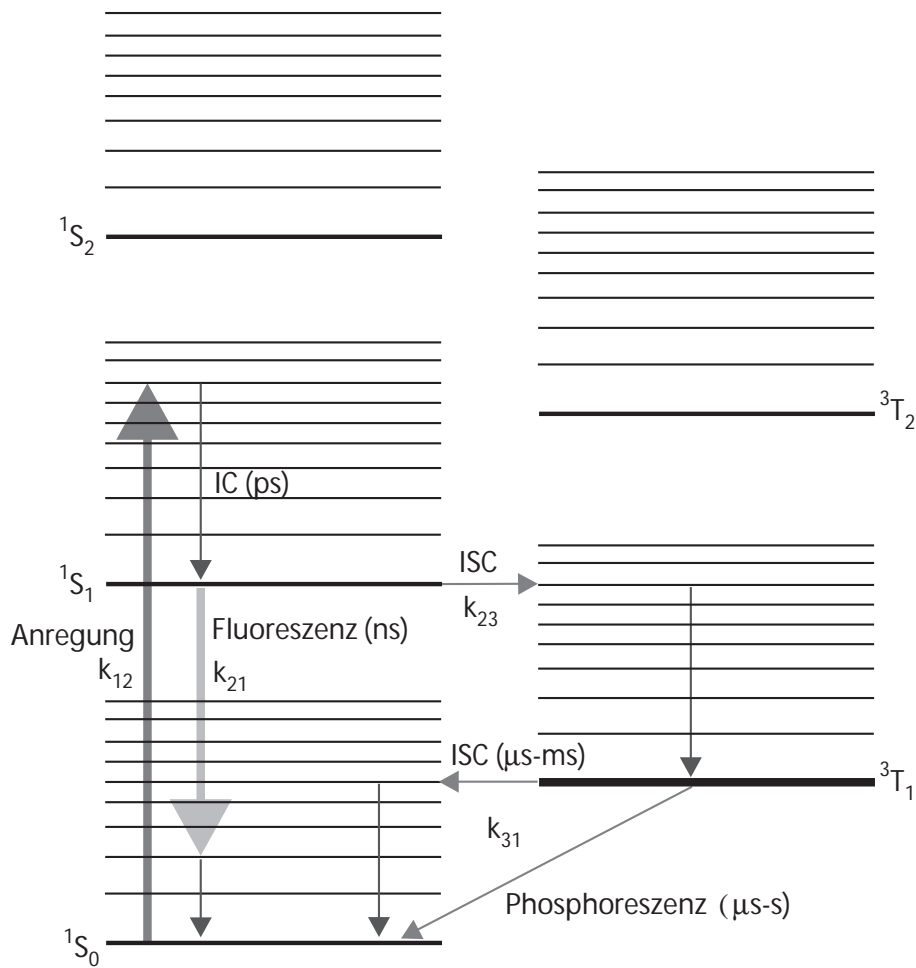


Abbildung 2.8: *Energieniveauschema eines Farbstoffmoleküls (Jablonski-Diagramm).*

In Abb. 2.8 ist die Lage der einzelnen Zustände veranschaulicht. Nach Absorption eines Photons befindet sich das Molekül zunächst im angeregten Zustand 1S_1 , von wo es entweder unter Emission eines Photons (Fluoreszenz) oder strahlungslos mit der Rate k_{21} in den Grundzustand 1S_0 relaxieren kann. Ebenso ist ein Übergang in das Triplettssystem mit der Rate k_{23} möglich (Intersystem Crossing - ISC), der aber mit einem optisch verbotenen Spinflip-Prozess verbunden ist und somit eine entsprechend geringe Wahrscheinlichkeit hat. Die Relaxation aus dem Triplettssystem in den Singulett-Grundzustand 1S_0 unter Emission eines Photons wird als Phosphoreszenz bezeichnet, ebenso ist auch in diesem Fall eine strahlungslose Relaxation möglich. In der folgenden Diskussion sollen Übergänge in das Triplettssystem vernachlässigt werden, da für die in den hier beschriebenen

nen Experimenten verwendeten Farbstoffe sowohl die Intersystemcrossingraten als auch die Triplettlebensdauern sehr klein sind.

Die Fluoreszenzemission erfolgt stets niederenergetischer als die Anregung, da ein Teil der Anregungsenergie in Schwingungs- und Rotationsenergie umgewandelt wird. Ebenso führt die Stokes-Verschiebung (Strukturrelaxation des Moleküls im angeregten Zustand auf Grund unterschiedlicher Polarisierung) zu einer weiteren Rotverschiebung der Fluoreszenz. Deshalb können für die Fluoreszenzdetektion die Fluoreszenzphotonen durch spektrale Filterung leicht von den Photonen des Anregungslichts getrennt werden.

Um eine Abschätzung der Fluoreszenzintensität von einem einzelnen Farbstoffmolekül bei Raumtemperatur zu erhalten, genügen zwei molekulare Parameter, die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f und der Absorptionswirkungsquerschnitt σ_a . Der Absorptionswirkungsquerschnitt kann als eine für die Absorption eines Photons effektive Fläche interpretiert werden. Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass nach Absorption eines Photons ein Fluoreszenzphoton emittiert wird. Gute Fluoreszenzfarbstoffe wie Rhodamin 6G (R6G) weisen ein Φ_f nahe 1 ($\Phi_f = 0.95$ für R6G) und einen sehr großen Absorptionswirkungsquerschnitt ($\sigma_a = 2 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$ für R6G) auf. Im Falle einer resonanten Anregung kann die Anregungsrate R_a als

$$R_a = \sigma_a \frac{I}{h\nu} \quad (2.20)$$

beschrieben werden (mit der Intensität I und Photonenenergie $h\nu$ des Anregungslichts). Bleibt die Anregungsrate R_a deutlich unter der Rate k_{21} dann kann die Lebensdauer des angeregten Zustands vernachlässigt werden und die Fluoreszenzrate R_f ergibt sich zu:

$$R_f = R_a \Phi_f = \frac{\Phi_f I \sigma_a}{h\nu} \quad (2.21)$$

Im Falle höherer Anregungsraten begrenzt jedoch die Lebensdauer des angeregten Zustands (k_{21}^{-1}) die Dynamik. Die maximal erzielbare Fluoreszenzrate ist dann k_{21} , der optische Übergang ist gesättigt. Mit einer für die Einzelmoleküldetektion üblichen Anregungsintensität von 1 kW/cm^2 ergibt sich im Beispiel des Farbstoffs Rhodamin 6G und einer Anregungswellenlänge von 514 nm eine Fluoreszenzrate von 4.25 MHz , was noch deutlich unter der Sättigungsrate von etwa 300 MHz liegt. Mit höheren Anregungsleistungen ist es allerdings leicht möglich,

den optischen Übergang eines einzelnen Moleküls zu sättigen.

Die Gesamtzahl der von einem einzelnen Molekül emittierten Photonen ist durch photochemische Veränderungen (Photobleaching), bei denen das Molekül irreversibel in einen nicht fluoreszierenden Zustand übergeht, begrenzt. Je nach chemischer Zusammensetzung der Umgebung² werden beispielsweise von einem Rhodamin 6G - Molekül 10^6 bis 10^8 Photonen emittiert, bis das Molekül irreversibel photochemisch verändert wird. Damit kann unter den oben beschriebenen Bedingungen die Fluoreszenz einzelner Moleküle bei Raumtemperatur immerhin einige Sekunden lang beobachtet werden.

2.3 Grundlagen der optischen Mikroskopie

2.3.1 Auflösungsvermögen und Detektionseffizienz

Im Folgenden sollen einige Punkte diskutiert werden, die für die optische Abbildung fluoreszierender Objekte wesentlich sind. Dazu wird ein ideales optisches System betrachtet, das aus einer einzigen Linse (dem Mikroskopobjektiv) endlicher Apertur besteht (Abb. 2.9). Zur Diskussion der in realen optischen Systemen auftretenden Effekte wie Bildfehler, Einflüsse kohärenter Beleuchtung etc. sei hier lediglich auf einige weiterführende Quellen verwiesen [101–103].

Drei wesentliche Aspekte, die nicht unabhängig voneinander sind, charakterisieren ein optisches System: die erreichbare optische Auflösung, der erzielbare Kontrast und die Effizienz der Detektion von Licht.

In Abbildung 2.9 ist unmittelbar zu erkennen, dass für die Detektionseffizienz der Öffnungswinkel Θ der Linse entscheidend ist. Statt des Öffnungswinkels wird zur Beschreibung von Objektiven meist die numerische Apertur $NA = n \sin(\Theta)$ verwendet, wobei n der Brechungsindex des Mediums ist, in das die Linse eingebettet ist. Die maximale Apertur einer Linse ist durch ihre geometrische Ausdehnung gegeben. Die tatsächlich nutzbare Apertur einer realen Optik, d.h. der Bereich, in dem Bildfehler optimal korrigiert sind, ist dagegen deutlich kleiner.

Ein auf die Linse fallender Parallelstrahl wird auf einen Punkt fokussiert, dessen Größe durch Fraunhofersche Beugung an der kreisförmigen Apertur der Linse

²Insbesondere scheint hier die Anwesenheit von Sauerstoffradikalen eine wesentliche Rolle zu spielen. In Experimenten, bei denen Sauerstoff ausgeschlossen wurde, konnte eine deutliche Verlängerung der Photolebensdauer einzelner Moleküle beobachtet werden [100].

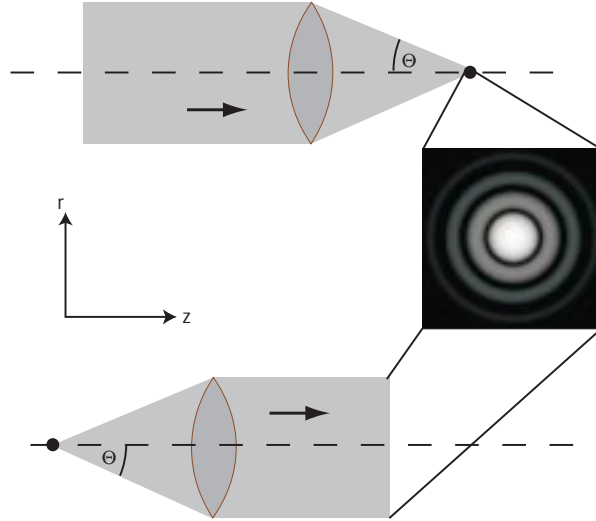


Abbildung 2.9: *Illustration des idealen optischen Systems. Oben: Abbildung eines Parallelstrahls auf einen Punkt. Unten: Abbildung einer punktförmigen Lichtquelle auf einen im Unendlichen befindlichen Detektor. Die Grafik zeigt die in beiden Fällen entstehende Intensitätsverteilung (Airy-Pattern).*

bestimmt wird. Die in der Bildebene im Abstand r von der optischen Achse entstehende Intensitätsverteilung $I(r)$ ist die sogenannte Airy-Funktion (Abbildung 2.9). Führt man mit $\rho = 2\pi r NA / \lambda$ (Lichtwellenlänge λ) einen dimensionslosen radialen Abstand ein, ergibt sich die Airy-Verteilung $I(\rho)$ als:

$$I(\rho) = \frac{4I_0 J_1^2(\rho)}{\rho^2} \quad (2.22)$$

Dabei ist I_0 die Intensität am Punkt $r = 0$ und $J_1(\rho)$ die Besselfunktion 1. Ordnung.

Die erste Nullstelle dieser Intensitätsverteilung liegt bei $r_0 = 0.61\lambda / NA$. Umgekehrt beschreibt diese Intensitätsverteilung auch die Abbildung einer im Fokus der Linse befindlichen punktförmigen Quelle auf einen entfernten Detektor (Abbildung 2.9). Nach dem Rayleigh-Kriterium zur optischen Auflösung können die Abbilder zweier punktförmiger Quellen genau dann noch unterschieden bzw. aufgelöst werden, wenn ihr Abstand nicht kleiner als r_0 ist. Auf einem Detektor weist die Intensitätsverteilung der beiden im Abstand r_0 befindlichen Punktquellen in der Mitte zwischen den beiden Zentren dann eine Intensitätsdifferenz von

26.5 % auf. Dieses Kriterium ist insofern willkürlich, als dass unter günstigen experimentellen Bedingungen (also viel Licht und wenig Rauschen) auch geringere Intensitätsdifferenzen noch zuverlässig aufgelöst werden können und unter ungünstigen Bedingungen auch Rayleigh-auflösbare Objekte nicht mehr getrennt werden können.

Damit wird klar, dass die Begriffe Kontrast und Auflösung für praktische Fragestellungen nicht getrennt diskutiert werden können. Als wesentliche Rauschquellen treten in der Fluoreszenzmikroskopie Streulicht und das durch die geringe Anzahl der detektierten Photonen bedingte Schrotrauschen auf. Während das Streulicht durch konstruktive Maßnahmen (Abschirmung des Umgebungslichts, spektrale Filterung des Fluoreszenzlichts) weitgehend minimiert werden kann, wird das Schrotrauschen (Anzahlschwankungen der Photonen) immer Bestandteil des detektierten Signals sein. Die Größe des Schrotrauschens ist proportional zur Wurzel aus der Photonenzahl, so dass es sich insbesondere im Fall schwacher Signale bemerkbar macht (siehe auch Abschnitt 2.4.2).

Laser, die in modernen Mikroskopen zunehmend als Lichtquellen eingesetzt werden, weisen ein gaußförmiges Intensitätsprofil auf:

$$I(r) = I_0 \exp\left(-\frac{r^2}{2\sigma_G^2}\right) \quad (2.23)$$

Gaußförmige Intensitätsverteilungen haben den Vorteil, dass sie forminvariant gegenüber Fouriertransformationen sind. Die Abbildung in optischen Systemen wird aber gerade durch Fouriertransformationen beschrieben, so dass das gaußförmige Intensitätsprofil bei optischen Abbildungen erhalten bleibt - entlang der optischen Achse ändert sich lediglich die Gaußbreite σ_G . Da die Intensität eines Gaußschen Strahls erst in unendlichem Abstand von der optischen Achse auf Null abfällt, wird für praktische Zwecke ein Strahldurchmesser definiert, bei dem die Intensität auf $1/e^2 = 0.135$ (bei $r = 2\sigma$) abgefallen ist. Wird nun ein gaußförmiger Parallelstrahl durch eine Linse endlicher Apertur abgebildet, so können Beugungseffekte vernachlässigt werden, wenn der Durchmesser $2a$ der Apertur deutlich größer als der oben definierte Strahldurchmesser ist. Die in der Bildebene entstehende Intensitätsverteilung ist dann wieder gaußförmig (Abb. 2.10) und kann durch

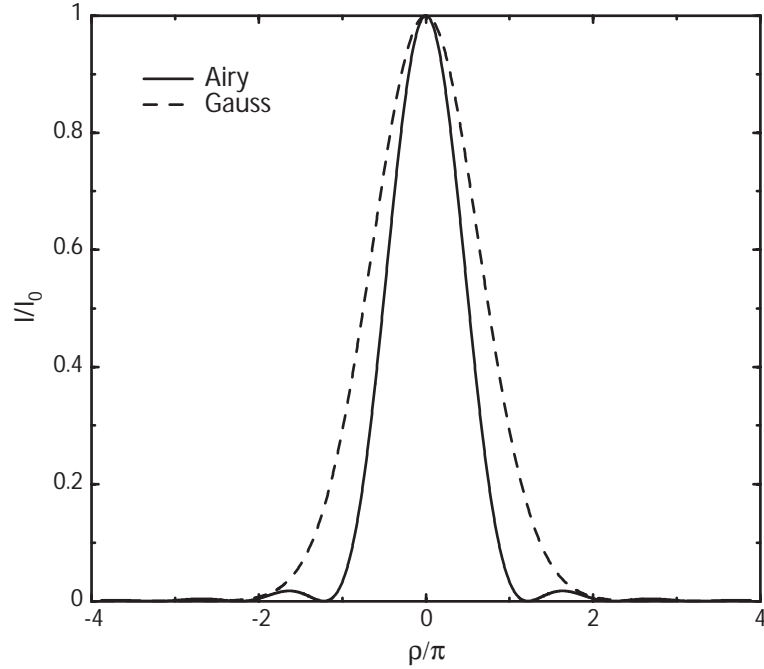


Abbildung 2.10: *Airy-Funktion und Gaußsche Intensitätsverteilung in der Fokusebene ($NA = 1$, $\sigma_G = 0.5a$).*

$$I = I_0 \exp\left(-\frac{\rho^2}{8}\right) \quad (2.24)$$

mit der Gaußbreite $\sigma_G = \lambda/(\pi NA)$ beschrieben werden. Ist der Aperturdurchmesser $2a$ dagegen klein gegen den Strahldurchmesser entsteht wiederum das oben beschriebene Airy - Muster. Dazwischen sind verschiedene Übergangsformen möglich, der kleinstmögliche Spotdurchmesser entsteht bei einer homogenen Beleuchtung der Apertur (Airy-Funktion). In diesem Fall geht jedoch auch der größte Teil der Intensität im Gaußschen Strahl verloren, so dass es praktisch immer erforderlich ist, einen Kompromiss zwischen dem erreichbaren Spotdurchmesser und der in den Spot transmittierten Intensität zu finden. In Abbildung 2.10 werden die Airy-Funktion und die Intensitätsverteilung eines gaußförmigen Fokus verglichen.

Eine weitere entscheidende Voraussetzung für die Detektion der Fluoreszenz einzelner Moleküle mittels optischer Mikroskopie ist eine hohe Gesamtdetektionseffizienz φ_{ges} der verwendeten optischen Komponenten, die als das Verhältnis der von einem einzelnen Molekül emittierten und der am Detektor nachgewie-

senen Fluoreszenzphotonen definiert ist. Neben der Effizienz des verwendeten Detektors geht in diese vor allem die Lichtsammeleffizienz φ_{Obj} der verwendeten Objektivlinse ein. Diese ergibt sich aus dem Verhältnis des vom Objektiv unter dem Öffnungswinkel Θ erfassten Raumwinkels

$$\Omega = 4\pi \sin^2(\Theta/2) \quad (2.25)$$

zum gesamten Raumwinkel Ω_{max} unter dem Photonen emittiert werden können. Mit $\Omega_{max} = 4\pi$ ergibt sich:

$$\varphi_{Obj} = \frac{\Omega}{\Omega_{max}} = \sin^2\left(\frac{\Theta}{2}\right) \quad (2.26)$$

Mit einem sehr guten Trockenobjektiv ($NA = 0.95$) erreicht man eine Detektionseffizienz von 0.34, ein sehr gutes Immersionsobjektiv ($NA = 1.4$) mit einem gut angepassten Immersionsmedium erreicht Detektionseffizienzen die nahe am theoretischen Limit von $\varphi_{max} = 0.5$ liegen.

Diese Werte sind jedoch Mittelwerte, wie man sie etwa bei schnell rotierenden einzelnen Molekülen oder Ensembles von Molekülen mit isotroper Orientierung erwarten kann. Tatsächlich emittiert ein einzelnes Molekül mit fester Orientierung jedoch eine Dipolstrahlung mit einer ausgeprägten Abstrahlcharakteristik, so dass in diesem Fall der oben definierte Wert von S deutlich über- als auch unterschritten werden kann. Die Abstrahlcharakteristik hängt zudem von den dielektrischen Eigenschaften der Umgebung (d.h. insbesondere von der Anwesenheit von Grenzflächen mit einem Sprung im Brechungsindex), in die das Molekül eingebettet ist, ab. In einer Reihe von Publikationen hat sich Enderlein [104–107] sehr ausführlich mit dieser Problematik beschäftigt und eine Reihe von Modellrechnungen durchgeführt. Hier sollen nur zwei qualitative Ergebnisse erwähnt werden:

- an einer Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex erfolgt der größte Teil der Dipolemission in Richtung des Mediums mit höherem Brechungsindex
- die maximale Detektionseffizienz erreichen Moleküle mit einer Dipolorientierung senkrecht zur optischen Achse

Für die Detektion von einzelnen Molekülen in einem ultradünnen Flüssigkeits-

film an der Oberfläche eines Quarzglassubstrats mit Hilfe eines Luftobjektivs heißt das, dass die Dipolemission bevorzugt in Richtung des Glassubstrats erfolgt und somit die Detektionseffizienz deutlich kleiner als oben angegeben ist. Weiterhin werden bevorzugt Moleküle detektiert, deren Emissionsdipol parallel zur Substratoberfläche orientiert ist.

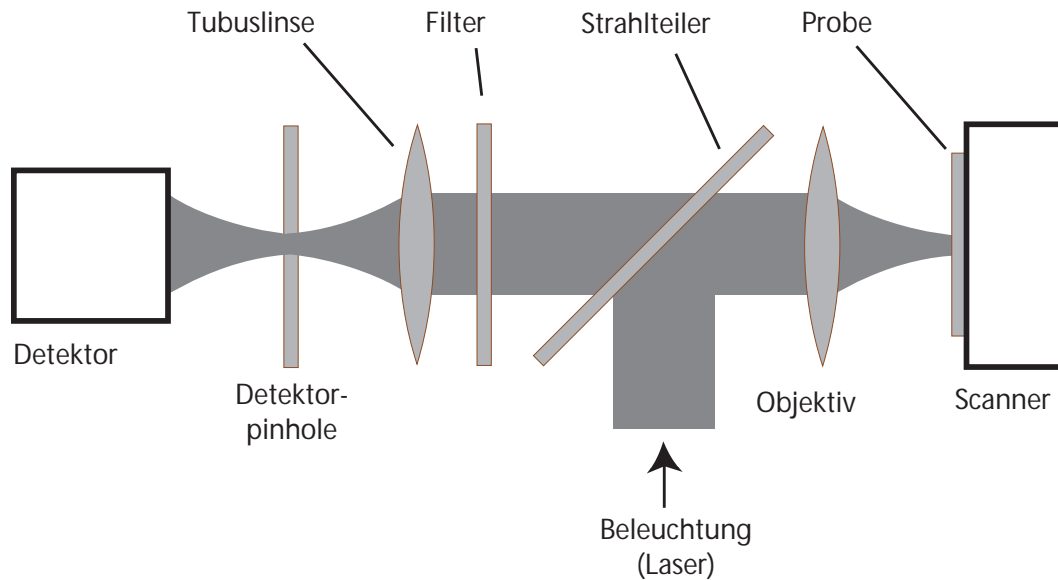
2.3.2 Konfokale Mikroskopie

Mit der Korrelationsspektroskopie und der Fluoreszenzburstanalyse existieren zwei Methoden zur Analyse von Diffusionsprozessen in Flüssigkeiten, die auf der konfokalen Mikroskopie beruhen. Deshalb soll zunächst der Aufbau eines konfokalen optischen Mikroskops übersichtsartig vorgestellt werden (Abb. 2.11).

Im Gegensatz zu herkömmlichen optischen Mikroskopen wird in einem konfokalen Mikroskop nur ein sehr kleiner Bereich der zu untersuchenden Probe mit einem beugungsbegrenzten Fokus beleuchtet, gleichzeitig wird auch nur aus diesem Anregungsfokus emittiertes (bzw. reflektiertes) Licht detektiert. Um ein Bild zu erzeugen, ist es somit nötig, die Probe punktweise abzurastern. Neben dieser Konfokalität im Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang, hat Konfokalität aber auch noch einen anderen Aspekt: Das von der Probe aus dem Anregungsfokus emittierte Licht wird auf ein Pinhole abgebildet, dessen Durchmesser in der Regel so gewählt wird, dass nur der innere Ring des Airy-Pattern einer möglichst punktförmigen Lichtquelle transmittiert wird.

Mit einem konfokalen Mikroskop ist es möglich, eine geringfügig verbesserte laterale Auflösung zu erreichen, der entscheidende Vorteil liegt jedoch darin, dass die Tiefenauflösung gegenüber herkömmlichen optischen Mikroskopen deutlich verbessert wird (etwa um einen Faktor 3 [101]). Für die Einzelmoleküldetektion in Volumenproben liegt der Vorteil der konfokalen Mikroskopie darin, dass auf Grund der verbesserten Tiefenauflösung tatsächlich nur Licht aus dem Anregungsspot detektiert wird und somit Streulicht aus anderen Bereichen der Probe zuverlässig diskriminiert wird.

Als Detektoren kommen in der Konfokalmikroskopie meist Avalanche-Photodioden oder Photomultiplier zum Einsatz. Zur Realisierung abbildender Konfokalmikroskopie bieten sich zwei Möglichkeiten: Bewegung der Probe unter einer raumfesten Optik (Sample Scanning) oder Bewegung des Anregungsspot gegenüber einer raumfesten Probe (Laser Scanning). Die Bewegung des Anregungs-

Abbildung 2.11: *Aufbau eines konfokalen Mikroskops.*

spots beim Laser Scanning wird durch bewegliche Spiegel realisiert, die Optik ist in diesem Fall deutlich aufwändiger, da sichergestellt werden muss, dass sich das Abbild des Anregungssports auf dem Detektor nicht mitbewegt.

2.3.3 Weitfeldmikroskopie

Im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie wird bei der Weitfeldmikroskopie ein ausgedehnter Bereich der Probe beleuchtet und das aus diesem Bereich emittierte oder reflektierte Licht simultan auf einen Flächendetektor abgebildet. Damit entsteht auf dem Detektor unmittelbar ein vollständiges Abbild der Probe. Es ist offensichtlich, dass mit der Weitfeldmikroskopie Bilder von der Probe mit einer wesentlich höheren Frequenz aufgenommen werden können als bei der konfokalen Mikroskopie, bei der das Bild Punkt für Punkt zusammengesetzt werden muss. Damit ist es beispielsweise möglich, die Diffusion einzelner Moleküle durch die Aufzeichnung und Analyse von Bildserien experimentell zu beobachten [32]. Als Detektoren werden bei der Weitfeldmikroskopie meist CCD-Kameras eingesetzt, deren Eigenschaften später diskutiert werden. Nicht unerwähnt bleiben soll natürlich, dass es in kommerziellen Weitfeldmikroskopen fast immer möglich ist, auch das menschliche Auge als Detektor zu nutzen.

In Weitfeldmikroskopen können eine Reihe unterschiedlicher Beleuchtungs-

konzepte genutzt werden. Allen gemeinsam ist das Ziel, die Probe möglichst homogen auszuleuchten. Bei optisch transparenten Proben ist es möglich, Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang zu trennen, was Konstruktion und Justage deutlich vereinfacht. Als für die Einzelmoleküldetektion besonders geeignet hat sich die Beleuchtung mittels Totalreflexion (Total Internal Reflection - TIR) erwiesen [33, 91, 96, 108]. Da bei dieser Methode die Probe durch das senkrecht zur Probenoberfläche nicht propagierende evaneszente Feld des total reflektierten Beleuchtungsstrahls beleuchtet wird, kann die Einkopplung von Streulicht in das Detektionssystem minimiert werden. Durch den exponentiellen Abfall des evaneszenten Felds mit zunehmendem Abstand von der Probenoberfläche bleibt die Anwendung dieser Methode auf oberflächennahe Bereiche in transparenten Proben beschränkt.

Abb. 2.12 illustriert den Aufbau einer TIR-Beleuchtung. In praktischen Anwendungen befindet sich die Probe nicht unmittelbar auf der Oberfläche des Prismas sondern auf einem dünnen transparenten Substrat, das mittels einer Immersionsflüssigkeit auf dem Prisma fixiert wird. Die Materialien werden dabei so gewählt, dass das System Prisma/Immersion/Substrat optisch möglichst homogen ist. Der Abfall der Intensität im evaneszentem Feld mit dem Abstand z von der Oberfläche wird durch:

$$I(z) = I(0) \exp\left(-\frac{z}{z_0}\right) \quad (2.27)$$

beschrieben, wobei z_0 die exponentielle Abklinglänge ist:

$$z_0^{-1} = \frac{4\pi n_S}{\lambda} \sqrt{\left(\frac{\sin(\alpha)}{\sin(\alpha_G)}\right)^2 - 1} \quad (2.28)$$

Dabei ist n_S der Brechungsindex des auf der Prismenoberfläche befindlichen Materials, α der Einfallswinkel des Strahls, α_G der Grenzwinkel der Totalreflektion des Prismas und λ die Lichtwellenlänge. Der Grenzwinkel der Totalreflexion

$$\alpha_G = \frac{n_S}{n_P} \quad (2.29)$$

wird wiederum durch die Brechungsindizes des Prismas (n_P) und der Probe (n_S) bestimmt.

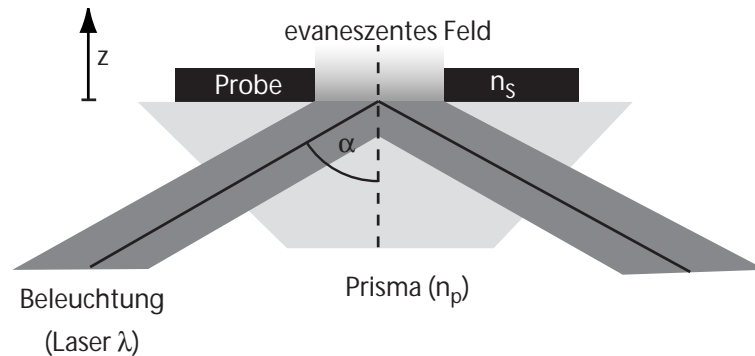


Abbildung 2.12: *Prinzipieller Aufbau einer TIR-Beleuchtung.*

Neben der Abklingcharakteristik des Strahls ist auch die Homogenität der Ausleuchtung der Probe entscheidend für die Eigenschaften des mikroskopischen Systems. Da die Beleuchtung der Probe in den hier diskutierten Experimenten durch einen Laserstrahl mit gaußförmigem Intensitätsprofil erfolgt, ist eine vollständig homogene Ausleuchtung der Probe prinzipiell nicht möglich. Um die bestmögliche Homogenität der Beleuchtung zu erhalten, muss der Laserstrahl so weit aufgeweitet werden, dass nur der innere Kern des Strahls, in dem das Profil relativ flach ist, den gewünschten Probenbereich ausleuchtet. Das heißt jedoch auch, auf einen Großteil der im Strahl befindlichen Lichtleistung zu verzichten, weshalb es in der Regel nötig ist, einen Kompromiss zwischen Homogenität der Ausleuchtung und dem Bedarf an Lichtleistung zu finden.

Abschließend sollen nun die in der Weitfeldmikroskopie eingesetzten Detektoren (CCD-Kameras) besprochen werden. Abb. 2.13 a) zeigt die Organisation eines CCD-Chips. CCD steht für Charge Coupled Device, das heißt in den einzelnen als Potentialmulden ausgeführten Pixeln werden Ladungen (Elektronen) gesammelt, die entstehen, wenn die einfallenden Photonen (bzw. Photoelektronen) im Bereich eines p-n-Übergangs Elektron-Loch-Paare erzeugen, die durch ein elektrisches Feld getrennt werden. Jedes dieser ladungsspeichernden Pixel hat nur eine bestimmte Kapazität, gelangen mehr Elektronen in das Pixel kommt es zum Überlauf der Ladung auf benachbarte Pixel.

Der CCD-Chip wird ausgelesen, indem zunächst Ladungen zwischen den Pixeln horizontal oder vertikal verschoben werden und schließlich in das am Rand

des Chips befindliche Shiftregister gelangen. Aus dem Shiftregister können dann die Ladungen wiederum zu einem Wandler verschoben werden, der für die in jedem einzelnen Pixel gespeicherte Ladung ein verstärktes analoges oder digitales Signal erzeugt. Diese Signale werden dann entweder in den Speicher eines PC übertragen oder es wird daraus ein analoges Videosignal erzeugt. In Abb. 2.13 b) und c) ist das Ausleseschema des Chips veranschaulicht.

Die Zeit T_{image} , die minimal zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bildern liegen kann, ergibt sich aus der Belichtungszeit $T_{exposure}$ und der für das Auslesen des Chips benötigten Zeit $T_{readout}$ mit

$$T_{image} = T_{exposure} + T_{readout} \quad (2.30)$$

Die maximal erreichbare Bildrate R_{image} ist dann

$$R_{image} = T_{image}^{-1} \quad (2.31)$$

Die Auslesezeit ergibt sich zu:

$$T_{readout} = N_x N_y (T_{sr} + T_v) + N_x T_i \quad (2.32)$$

(N_x und N_y sind die Dimension des Chips in Pixeln, T_{sr} ist die Zeit, die für den Shift eines Pixels im Shiftregister benötigt wird, T_v die Zeit, die für die Verstärkung bzw. Digitalisierung eines Pixels benötigt wird und T_i die Zeit für den Shift einer kompletten Zeile oder Spalte in das Shiftregister). Die Shift-Zeiten für einzelne Pixel (T_i, T_{sr}) sind in der Regel deutlich kürzer als die Digitalisierungszeit T_v .

Damit ergeben sich einige wichtige Anforderungen an den Betrieb eines CCD-Chips: Der Chip darf nur so lange belichtet werden, dass keines der Pixel seine maximale Kapazität überschreitet. Während des Auslesens darf der Chip nicht belichtet werden, da sonst Ladungen über den Chip verschmiert werden. Entscheidende Parameter zur Beschreibung eines CCD-Chips sind somit die Kapazität der Pixel, die Geschwindigkeit der Ladungsverschiebung und der Signalwandlung sowie das bei der Signalwandlung und -verstärkung entstehende Rauschen (Ausleserauschen). Während die Ladungstransfers innerhalb der Pixel-Arrays und der Register sehr schnell erfolgen können, benötigt eine rauscharme Signalwandlung relativ viel Zeit. Da die Abdunklung des Chips während des

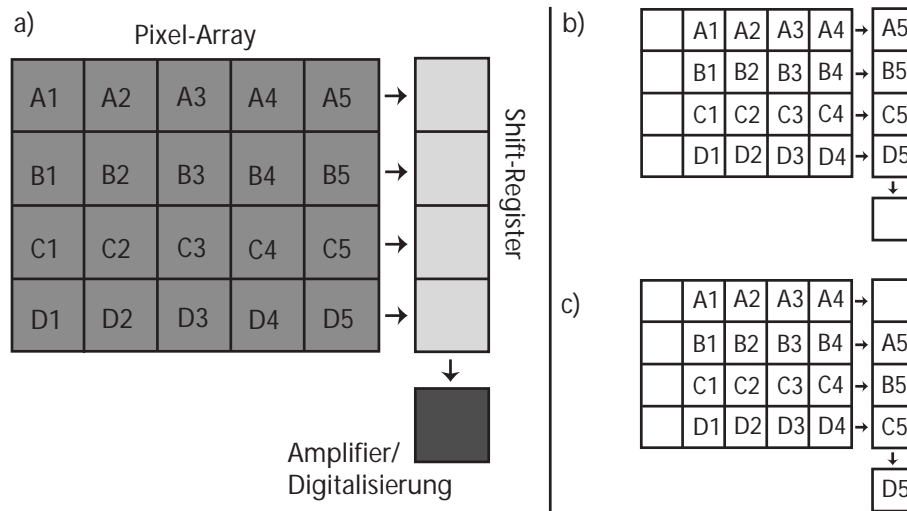


Abbildung 2.13: Organisation eines CCD-Chips: a) Übersicht am Beispiel eines aus 4 x 5 Pixeln bestehenden Chips, b) Horizontaler Shift von Ladungen in das Shiftregister, c) Vertikaler Ladungstransfer im Shiftregister zum Ausleseregister.

Auslesens technisch aufwändig ist und eine kontinuierliche Bildaufnahme verhindert, wurden Frame-Transfer-CCDs entwickelt. Diese Chips bestehen aus zwei identischen Pixel-Arrays, von denen eines permanent abgedeckt ist. Damit ist es möglich, ein Array zu belichten und die Ladungen sehr schnell in das abgedeckte Array zu verschieben, welches dann langsam ausgelesen werden kann, während das erste Array schon wieder belichtet wird.

Ein beschleunigtes Auslesen des Chips kann auch durch die Auswahl sogenannter Regions of Interest (ROI) erreicht werden. Dabei wird zwar der komplette Chip beleuchtet, aber nur der als ROI definierte Bereich ausgelesen.

Werden CCD-Chips von der Vorderseite belichtet, auf der sich die für die Realisierung der Steuerung nötigen Halbleiterstrukturen befinden, wird ein großer Teil des Lichts vor allem in den Gate-Strukturen absorbiert. Um die Quantenausbeute zu erhöhen, werden deshalb von der Rückseite beleuchtete (backilluminated) CCDs eingesetzt, deren Herstellung jedoch gegenüber frontbeleuchteten CCDs deutlich aufwändiger ist. Mit hintergrundbeleuchteten CCDs können Quantenausbeuten bis zu 90% im sichtbaren Spektralbereich erreicht werden. Generell sind jedoch bei der Detektion schwacher Signale immer noch hohe Belichtungszeiten nötig, um wenigstens so viele Ladungen zu akkumulieren, dass das Ausleserauschen der Chips deutlich überschritten wird.

Für die Detektion schwacher Signale (also z. B. der Fluoreszenz einzelner Moleküle) mit einer hohen Bildrate sind deshalb intensivierte CCD-Kameras vorteilhaft. Bei diesen I-CCDs befindet sich vor jedem einzelnen Pixel ein Intensifier, der das eingehende Signal (analog zu einem Photomultiplier) verstärkt. Aus einem auf der Photokathode des Intensifiers einfallenden Photon entstehen viele Photoelektronen, die wiederum auf dem CCD-Chip Elektron-Loch-Paare erzeugen. Damit ist es möglich, bereits mit wenigen detektierten Photonen das Ausleserauschen des CCD-Chips deutlich zu überschreiten, so dass schwache Signale bereits bei sehr kurzen Belichtungszeiten erfasst werden können.

Neben dem Ausleserauschen spielt in CCD-Kameras auch das Dunkelrauschen des CCD-Chips bzw. des Intensifiers eine Rolle. Durch Kühlung der Detektoreinheit kann das Dunkelrauschen jedoch soweit minimiert werden, dass tatsächlich das Ausleserauschen die dominierende Rauschquelle ist. Bei sehr guten CCDs kann man mittlerweile das Ausleserauschen auf wenige Photoelektronen pro Frame und Pixel reduzieren.

Die Quantenausbeute von CCD-Chips zeigt eine ausgeprägte spektrale Abhängigkeit. Während nicht intensivierte CCD-Kameras ihre maximale Empfindlichkeit im roten und nahinfraroten Bereich (600 - 800 nm) haben, können intensivierte Kameras durch geeignete Auswahl des Materials der Photokathode auch für eine maximale Empfindlichkeit im ultravioletten oder blau/grünen Spektralbereich optimiert werden.

2.4 Methoden zur Analyse von Diffusionsprozessen auf der Basis der Einzelmoleküldetektion

2.4.1 Korrelationsspektroskopie und Fluoreszenzburstanalyse

Beide Methoden basieren auf der konfokalen Mikroskopie, wobei das konfokale Mikroskop in einem nicht abbildenden Modus betrieben wird. Der Anregungsfokus beleuchtet einen bestimmten Bereich einer flüssigen Probe und das räumliche Verhältnis von Probe und Anregungsfokus bleibt unverändert. Befinden sich in der Probe nun fluoreszierende Moleküle in einer geringen Konzentration, so ist offensichtlich, dass sich durch die Diffusionsbewegung die Zahl der im Fokalvo-

lumen befindlichen fluoreszierenden Moleküle ständig ändert. Damit folgt aber auch, dass das aus dem Anregungsfokus detektierte Fluoreszenzsignal ebenfalls zeitliche Fluktuationen aufweist. Die Analyse dieser zeitlichen Fluktuationen der in einem konfokalen Fokus detektierten Fluoreszenzintensität ist Gegenstand der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Im Limit der Beobachtung einzelner Moleküle spricht man bei den von einzelnen durch den Fokus diffundierenden Molekülen emittierten Fluoreszenzsignalen, die durch Dunkelintervalle unterbrochen werden, von so genannten Fluoreszenzbursts. Die statistische Auswertung des Auftretens dieser Fluoreszenzbursts ist Gegenstand der Fluoreszenzburstanalyse.

Da mit den hier beschriebenen Methoden eine quantitative Analyse von Diffusionsprozessen erreicht werden soll, ist es zunächst erforderlich, das konfokale Anregungsvolumen näher zu beschreiben. Dazu wird die so genannte Point Spread Function (*PSF*) betrachtet, die das Übertragungsverhalten eines punktförmigen Objekts durch das optische System beschreibt. Im konfokalen Mikroskop ergibt sich die *PSF* für das Gesamtsystem PSF_{ges} als Faltung der jeweiligen *PSF* des Beleuchtungs- und des Detektionsstrahlengangs:

$$PSF_{ges} = PSF_{bel} \otimes PSF_{det} \quad (2.33)$$

Für praktische Zwecke ist es üblich [30], das konfokale Anregungsvolumen als gaußförmigen Spot mit

$$I(r, z) = I_0 \exp\left(-\frac{r^2}{2\sigma_r^2}\right) \exp\left(-\frac{z^2}{2\sigma_z^2}\right) \quad (2.34)$$

zu beschreiben (Abb. 2.10). Dabei handelt es sich um eine sehr gute Näherung, sofern die Eintrittspupille des Objektivs von einem gaußförmigen Laserstrahl ohne Clipping ausgeleuchtet wird und der Durchmesser des Detektionsspinholes größer als eine Airy-Einheit ist. Die zugehörigen Parameter $2\sigma_r$ und $2\sigma_z$, die die Breite des Anregungsvolumens (bei $I = I_0/e^2$) in lateraler (r) und axialer (z) Richtung beschreiben, können experimentell durch abbildende konfokale Mikroskopie an punktförmigen Testobjekten bestimmt werden. Die axiale Ausdehnung des Anregungsvolumens ist, abhängig vom verwendeten Objektiv, deutlich größer als die laterale, so dass z.B. für die Analyse von Diffusionsprozessen das Anregungsvolumen als unendlich ausgedehnter Zylinder angesehen werden kann [30]. Das bedeutet aber, dass von einem dreidimensionalen Diffusionsprozess mit konfoka-

ler Mikroskopie nur dessen zweidimensionale Projektion auf eine Ebene senkrecht zur optischen Achse beobachtet und analysiert werden kann. Die charakteristische Zeit τ_D , für die ein durch den Spot diffundierendes Molekül zu detektieren ist, wird in erster Näherung durch

$$\sigma_r^2 = D \tau_{Diff} \quad (2.35)$$

beschrieben. Exakt ist dieser Ausdruck für einen Diffusionsprozess, der in der Mitte des Fokalvolumens startet (eine genaue Diskussion erfolgt im Abschnitt 4.3.1).

Die stärksten Fluktuationen im Fluoreszenzsignal werden erreicht, wenn sich im Mittel weniger als ein Sondenmolekül im Anregungsvolumen befindet. Dies ist der Fall, wenn das durchschnittlich einem Sondenmolekül zur Verfügung stehende Probenvolumen $V_{mol} = 1/c$ deutlich größer als das Anregungsvolumen V_{fok} ist, wobei c die Konzentration der Sondenmoleküle angibt. Die mittlere Anzahl n von Molekülen im Anregungsvolumen ergibt sich zu:

$$\langle n \rangle = \frac{V_{fok}}{V_{mol}} \quad (2.36)$$

Das Anregungsvolumen ist ein Ellipsoid mit dem Volumen:

$$V_{fok} = \frac{32}{3} \pi \sigma_r^2 \sigma_z \quad (2.37)$$

Die Zahl der Moleküle m , die sich zu einem bestimmten Zeitpunkt im Anregungsvolumen befinden wird durch eine Poisson-Verteilung

$$P_m = \frac{\langle n \rangle^m}{m!} \exp(-\langle n \rangle) \quad (2.38)$$

beschrieben. Für ein Anregungsvolumen von 0.3 fl und eine Konzentration von 1 nM ergibt sich beispielsweise eine mittlere Anzahl von nur $\langle n \rangle = 0.18$ Molekülen, d.h. das Anregungsvolumen ist zu 83% der Zeit leer, zu 15% mit einem einzelnen Molekül und zu 2% mit zwei Molekülen besetzt. Die Wahrscheinlichkeit für $n > 2$ ist bereits vernachlässigbar klein. Während die geometrischen Abmessungen des Anregungsvolumens also die charakteristische Diffusionszeit (die Dauer der Fluoreszenzbursts) bestimmen, wird die Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden

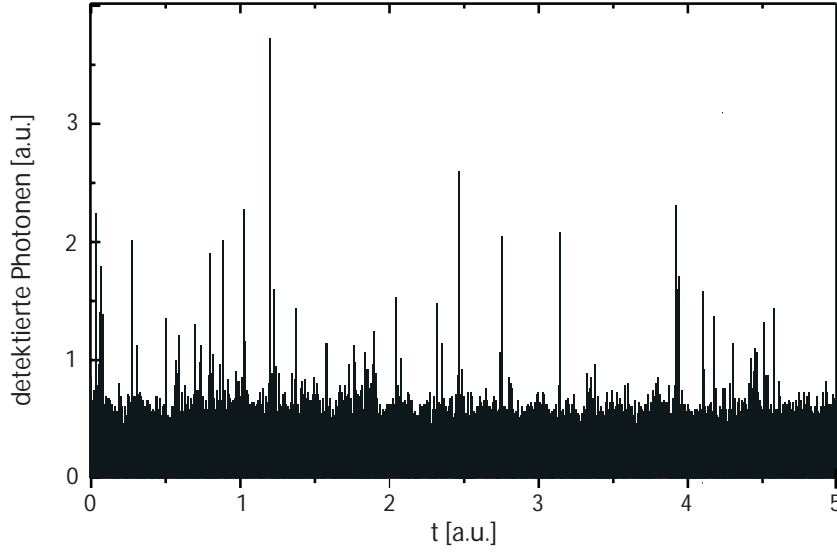


Abbildung 2.14: *Beispiel für den Verlauf von Zeitreihen der Fluoreszenzintensität.*

Molekülen, d.h. die Frequenz der Fluoreszenzbursts durch die Konzentration bestimmt.

Abb. 2.14 zeigt Zeitreihen der detektierten Fluoreszenzintensität, wie sie mit einem hochempfindlichen konfokalen Mikroskop beobachtet werden können. Während bei der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie die Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2.39)$$

analysiert wird, werden bei der Fluoreszenzburstanalyse in den Zeitreihen zunächst Bursts von individuellen Molekülen identifiziert. Aus der Verteilung der Burstlängen - also der Zeit, die Moleküle benötigen, um den Anregungspot zu durchqueren - können dann Diffusionskoeffizienten berechnet werden. Die Details der Datenanalyse werden im Abschnitt 4.3.1 ausführlich diskutiert. Beiden Methoden gemeinsam ist, dass statistische Methoden benutzt werden, um aus vielen Fluoreszenzbursts von jeweils verschiedenen einzelnen Molekülen mittlere Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Mit den in diesem Abschnitt beschriebenen Methoden ist eine Bestimmung eines Diffusionskoeffizienten für ein individuelles Molekül also nur bedingt möglich. Der Vollständigkeit halber soll hier noch die Form der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ für den Fall von mit einer Diffusions-

konstante D diffundierenden Molekülen angegeben werden:

$$G(\tau) = 1 + \langle n \rangle \left(1 + \frac{D\tau}{\sigma_r^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{D\tau}{\sigma_z^2} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (2.40)$$

In der oben erwähnten Näherung, den Fokus als unendlich ausgedehnten Zylinder zu behandeln ($\sigma_z = \infty$) vereinfacht sich $G(\tau)$ zu:

$$G(\tau) = 1 + \langle n \rangle \left(1 + \frac{D\tau}{\sigma_r^2} \right)^{-1} \quad (2.41)$$

In [30] werden beide Ansätze verglichen und es wird gezeigt, dass die zweidimensionale Näherung der Diffusion die experimentellen Daten gut beschreibt. Herleitungen von $G(\tau)$ finden sich in [109–111]. Mittels der Korrelationsspektroskopie können auch anomale Diffusionsprozesse analysiert werden [34], wobei entsprechend modifizierte Ausdrücke für $G(\tau)$ zur Beschreibung der Daten verwendet werden.

2.4.2 Single Molecule Tracking

Die Analyse der Bewegung einzelner Moleküle mittels Videomikroskopie, wird als Single Molecule Tracking (SMT) bezeichnet. Das Grundprinzip dieser Methode ist jedoch älter. Bei der als Single Particle Tracking (SPT) bezeichneten Methode werden fluoreszierende oder lichtstreuende Partikel von mesoskopischer Größe verfolgt, um Strömungen in Flüssigkeiten oder Diffusionsprozesse zu untersuchen.

Im Folgenden konzentrieren sich die Ausführungen auf den Fall der Diffusion in Abwesenheit von hydrodynamischen Störungen. Bei der Auswertung von SPT- oder SMT-Experimenten stehen zwei Fragestellungen im Vordergrund: Wie genau kann man die Position eines Teilchens in einem Einzelbild bestimmen? Wie genau kann man aus einer Trajektorie, die aus L_T Einzelbeobachtungen besteht, einen Diffusionskoeffizienten bestimmen?

Prinzipiell lässt sich die Position eines Teilchens in einem videomikroskopischen Bild beliebig genau bestimmen, vorausgesetzt, man kennt die Übertragungsfunktion des Mikroskops (PSF) und man hat ein beliebig starkes Signal. In einem realen Experiment kennt man dagegen die Übertragungsfunktion nur näherungsweise und die Qualität des Signals ist durch verschiedene Rauschquellen

begrenzt. Dazu kommen noch Einschränkungen, die durch die Pixelstruktur des Detektors gegeben sind. Das Auflösungsvermögen des Mikroskops spielt dagegen fast keine Rolle, sofern sichergestellt werden kann, dass in einem gegebenen Bildbereich tatsächlich nur ein einzelnes Teilchen abgebildet wird.

Unter der Annahme, dass die Übertragungsfunktion durch eine Gaußverteilung beschrieben wird, gibt Kubitschek [95, 112] folgende Formel für die Lokalisierungsgenauigkeit $\sigma(r)$ (Streuung) an:

$$\sigma(r) = \sqrt{3.53 \left[\sum_{i=-N_x}^N \sum_{j=-N_y}^M \frac{(I_0^2 x_i^2 / \sigma_{xy}^4) \exp[-(x_i^2 + y_i^2) / 2\sigma_{xy}^2]}{\sigma_{bg}^2 + \sigma^2(I(x_i, y_i))} \right]^{-1}} \quad (2.42)$$

Dabei ist I_0 die maximale Intensität im Bildausschnitt ($2N_x + 1 \times 2N_y + 1$ Pixel), σ_{xy} ist die Gaußbreite des Teilchens auf dem Detektor, x_i und y_i sind die Koordinaten auf dem Detektor und σ_{bg} bzw. $\sigma(I(x_i, y_i))$ sind die Streuungen der Untergrundintensität und der Intensität am Ort x_i, y_i . Mit der Definition des Signal/Rausch-Verhältnis (SNR)

$$SNR = \frac{I_o}{\sqrt{\sigma_{bg}^2 + \sigma_{I_o}^2}} \quad (2.43)$$

ergibt sich näherungsweise:

$$\sigma(r) \approx \frac{q}{SNR} \quad (2.44)$$

wobei q eine Größe ist, die nur von den Diskretisierungsintervallen des Detektors im Verhältnis zur Gaußbreite σ_{xy} abhängt und die Dimension einer Länge hat. Für ein gegebenes Videomikroskop ist also die Lokalisierungsgenauigkeit näherungsweise proportional zum Inversen des SNR. Für Experimente mit einem hohen SNR ist es möglich, Lokalisierungsgenauigkeiten zu erzielen, die deutlich unterhalb des Beugungslimits liegen und Werte von wenigen Nanometern erreichen können.

Weiterhin sollen nun einige Ergebnisse zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten aus Trajektorien einzelner Teilchen diskutiert werden. Eine Trajektorie besteht aus L_T einzelnen Positionsbestimmungen zu Zeiten t_i und stellt jeweils eine Realisierung eines Zufallspfads dar. Verschiedene Trajektorien realisieren nun unterschiedliche Zufallspfade, die auch unterschiedliche Werte der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) $\langle r^2(\tau) \rangle$ ergeben. Werden nun mittels Gleichung

2.17 durch lineare Regression diesen MSD Diffusionskonstanten zugeordnet, ergeben sich für verschiedene Realisierungen unterschiedliche Diffusionskonstanten D , die eine Verteilung der Breite $\sigma(D)$ aufweisen, obwohl allen Realisierungen ein Random Walk zu Grunde liegt, der durch den gleichen Wert von \overline{D} charakterisiert ist. Bei der Auswertung von experimentellen Daten stellt sich damit die Frage, ob die beobachtete Streuung von D statistisch begründet ist oder ob sie das Ergebnis von Heterogenitäten der Probe ist, die über die statistische Streuung hinausgehen.

In einer Reihe von Computersimulationen hat Saxton [113] untersucht, wie unter diesen Bedingungen einer Trajektorie eine statistisch relevante Diffusionskonstante zugeordnet wird und wie groß die Streuung der Diffusionskonstanten unter gegebenen Bedingungen ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden zusammengefasst. Zunächst zeigt Saxton zwei Möglichkeiten auf, $\langle r^2(\tau) \rangle$ für eine Trajektorie zu berechnen, indem über alle oder nur über unabhängige Paare von Punkten $r(t_i)$, $r(t_i + \tau)$ mit einer bestimmten Zeitdifferenz τ gemittelt wird. Mittelung über unabhängige Paare heißt dabei, dass nur Paare in die Mittelung einbezogen werden, die sich zeitlich nicht überlappen. Auf der Trajektorie existieren jeweils $N_A = L_T - \varepsilon$ überlappende und $N_L = \lfloor L_T - 1/\varepsilon \rfloor$ nicht überlappende Segmente. Mit ε wird der Indexabstand zwischen zwei Punkten der Trajektorie bezeichnet³. Saxton konnte zeigen, dass die Mittelung über alle Paare vorzuziehen ist, da bei dieser die vorhandene Datenmenge besser ausgenutzt wird, obwohl die Mittelung über unabhängige Paare den Vorteil hat, dass Korrelationen zwischen zeitlich dicht benachbarten Gebieten der Trajektorie unterdrückt werden.

Ferner weist Saxton daraufhin, dass die Werte von $\langle r^2(\tau) \rangle$ für die Berechnung von D entsprechend ihrer statistischen Relevanz gewichtet werden müssen, also Werte für kleine ε , die statistisch signifikanter sind, höher gewichtet werden. Die Streuung der Werte von D nimmt mit zunehmender Länge der Trajektorien ab, das heißt, es ist wichtig, möglichst lange Trajektorien aufzuzeichnen, um D zuverlässig zu bestimmen.

Im Falle der Berechnung des MSD über alle Paare wird die Varianz für die

³Für zwei Positionsbestimmungen $\underline{r}(t_i)$ und $\underline{r}(t_j)$ zu Zeiten t_i und t_j ($j > i$) beträgt der Indexabstand $\varepsilon = j - i$ und der Zeitabstand $\tau = t_j - t_i$.

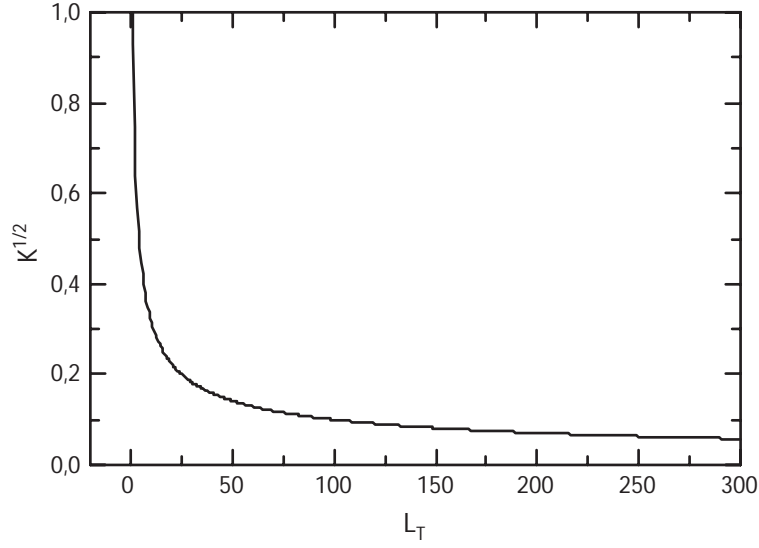


Abbildung 2.15: *Streuung des MSD in Abhängigkeit von der Trajektorienlänge.*

Bestimmung von $\langle r^2(\tau) \rangle$ angegeben als:

$$\text{Var} \langle r^2(\tau) \rangle = (4\overline{D}\tau)^2 K \quad (2.45)$$

Dabei gilt für $N_A \geq \varepsilon$:

$$K = (4\varepsilon^2 N_A + 2N_A + \varepsilon - \varepsilon^3) / (6\varepsilon N_A^2)$$

und für $N_A \leq \varepsilon$:

$$K = 1 + (N_A^3 - 4\varepsilon N_A^2 + 4\varepsilon - N_A) / (6\varepsilon^2 N_A)$$

Abbildung 2.15 zeigt den Verlauf von \sqrt{K} für $\varepsilon = 1$ in Abhängigkeit von der Trajektorienlänge. Die Größe \sqrt{K} entspricht der relativen Streuung des MSD:

$$\sqrt{K} = \frac{\sigma \langle r^2(\tau) \rangle}{\sqrt{\langle r^2(\tau) \rangle}} \quad (2.46)$$

Eine geschlossene Lösung für die Form der Verteilung $p(\langle r^2(\tau) \rangle)$ existiert nur für den Fall der Mittelung über unabhängige Paare bei der Berechnung des

MSD [113, 114]. Diese wird durch eine Gamma-Verteilung der Form

$$p\left(\left\langle r^2(\tau) \right\rangle\right) = \frac{N_l}{4\overline{D}\tau \Gamma(N_l)} \left(\frac{\left\langle r^2(\tau) \right\rangle N_l}{4\overline{D}\tau}\right)^{N_l-1} \exp\left(-\frac{\left\langle r^2(\tau) \right\rangle N_l}{4\overline{D}\tau}\right) \quad (2.47)$$

beschrieben. \overline{D} gibt den Mittelwert des Diffusionskoeffizienten an, $\Gamma(N_l)$ ist die Gamma-Funktion. Die Breite dieser Verteilung ist dann durch

$$Var\left\langle r^2(\tau) \right\rangle = (4\overline{D}\tau)^2/N_l \quad (2.48)$$

gegeben.

Kapitel 3

Computersimulationen zur Analyse von Diffusionsprozessen mittels Videomikroskopie

3.1 Fragestellungen

Die in diesem Kapitel beschriebenen Computersimulationen verfolgen im Wesentlichen zwei Ziele. Zum einen soll anhand von Beispielen deutlich gemacht werden, welche Aussagen über Diffusionsprozesse auf der Basis der Beobachtung von Diffusionstrajektorien einzelner Moleküle mittels Videomikroskopie gemacht werden können und wo die Grenzen dieser Methode liegen. Dieser Teil baut auf dem im Abschnitt 2.4.2 zusammengefassten Kenntnisstand auf. Zum anderen soll mit Hilfe von Computersimulationen eine neuartige Methode zur Analyse von Diffusionsprozessen auf Einzelmolekülebene vorgestellt und modelliert werden. Diese Methode nutzt die Tatsache, dass die Diffusionsbewegung der Moleküle während der Belichtung der CCD-Kamera zu einer Verschmierung bzw. Verbreiterung der auf der Kamera abgebildeten Fluoreszenzspots führt. Die Analyse der Größe dieser Spots wird im Folgenden als Spotgrößenanalyse (Spot Size Analysis - SSA) bezeichnet. Gegenüber dem Beugungslimit vergrößerte Spots bei der Abbildung einzelner diffundierender Moleküle wurden erstmals in Arbeiten von Schmidt et al. [38] und Xu et al. [39] beschrieben, eine systematische Analyse und Auswertung erfolgte allerdings nicht. Es liegt jedoch nahe, zu versuchen, aus der Größe dieser Spots näherungsweise eine Diffusionskonstante zu berechnen. Da eine ex-

akte analytische Behandlung dieses Problems nicht möglich ist, kann nur auf der Basis von Computerexperimenten versucht werden, einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Spotverbreiterung und der Diffusionskonstante, die den jeweiligen Diffusionsprozess beschreibt, herzustellen.

Ähnlich wie bei der Analyse von Diffusionsprozessen mittels der Berechnung der mittleren quadratischen Verschiebung (Mean Square Displacement - MSD) stößt man jedoch auch hier auf das Problem, dass Diffusionsprozesse, die mit ein- und derselben Diffusionskonstante beschrieben werden, durchaus zu unterschiedlichen Formen und Größen der beobachteten Fluoreszenzspots führen können. Damit kann auch in der Spotgrößenanalyse den an einem einzelnen Molekül gemessenen Daten nur näherungsweise ein Diffusionskoeffizient mit einer endlichen Unsicherheit zugeordnet werden.

3.2 Computersimulationen

Mittels der hier beschriebenen Computersimulationen wird die Entstehung eines Abbildes eines diffundierenden Moleküls auf einer CCD-Kamera modelliert. Dazu wird zunächst ein zweidimensionaler¹ Zufallspfad auf einem Grundgitter modelliert, indem in jedem Zeitschritt ein Schritt in Richtung der x- und der y- Achse mit einer Schrittweite von +1, -1 oder 0 (mit jeweils gleicher Wahrscheinlichkeit) durchgeführt wird. Auf dem Grundgitter wird für jeden einzelnen Gitterpunkt die Besuchshäufigkeit aufgezeichnet. Die Länge eines einzelnen Zufallspfads beträgt jeweils $T_E \cdot L_T$ Zeitschritte. Dabei wird T_E im Folgenden als Belichtungszeit und L_T als Trajektorienlänge bezeichnet. Insgesamt werden jeweils N_T Realisierungen eines solchen Zufallspfads modelliert.

Die Abbildung auf die CCD-Kamera wird modelliert, indem nach jeweils T_E Schritten die Besuchshäufigkeit auf dem Grundgitter mit einer Gaussverteilung der Breite σ_G gefaltet wird (Modellierung der beugungslimitierten Abbildung) und auf ein gröberes Gitter (Kamera mit Pixeln endlicher Größe) projiziert wird. Dabei wird angenommen, dass die Fluoreszenzintensität des simulierten Moleküls

¹Da mit den hier beschriebenen experimentellen Aufbauten nur laterale Komponenten der Diffusion analysiert werden, beschränken sich auch die Simulationen auf eine zweidimensionale Modellierung der Diffusionsprozesse. Im Fall normaler Diffusion gilt stets, dass die zweidimensionale Projektion eines dreidimensionalen Diffusionsprozesses als zweidimensionaler Diffusionsprozess mit der gleichen Diffusionskonstante interpretiert werden kann.

an einem bestimmten Punkt des Grundgitters proportional zu seiner Besuchshäufigkeit ist. Die nach der Belichtungszeit T auf das Kameragitter projizierte Besuchshäufigkeit entspricht also dem Abbild eines diffundierenden Moleküls mit einem Weitfeldmikroskop auf eine CCD-Kamera, wobei sowohl die beugungslimitierte Auflösung als auch die Digitalisierungseffekte der Kamera berücksichtigt werden. Das Verhältnis von Auflösung und Pixelgröße wurde so gewählt, dass es etwa der im folgenden Kapitel beschriebenen experimentellen Situation entspricht (die Fläche der nicht durch Diffusion verbreiterten Gauß-Spots beträgt $\sigma_G^2 = 2.04$, gemessen in Pixeleinheiten auf dem Kameragitter).

Nach der Belichtungszeit T_E werden jeweils alle Besuchshäufigkeiten auf Null gesetzt, die letzte Position des Zufallspfades wird als Ausgangspunkt für die Fortsetzung des Zufallspfades beibehalten. Auf diese Weise entstehen Folgen aus L_T Bildern, die den Bilderserien von einem einzelnen diffundierenden Molekül im Experiment entsprechen. Bestimmt man nun im Bild i die mittlere Position \underline{r}_i des simulierten Moleküls, so erhält man eine Trajektorie des Diffusionsprozesses mit L_T Stützpunkten.

Alle Simulationen wurden auf einem Grundgitter von 196×196 Punkten und einem Kameragitter von 49×49 Pixeln durchgeführt. Damit ergeben sich Diffusionskonstanten von $D_{GG} = 1/3$ (Grundgitter) bzw. $D_{KG} = 1/48 = 2.083 \cdot 10^{-2}$ (Kameragitter), jeweils gemessen in Einheiten des jeweiligen Gitters und bezogen auf einen Zeitschritt. Simulationen wurden für verschiedene Werte von T_E , L_T und N_T durchgeführt, um den Einfluss der Belichtungszeit und der Trajektorienlänge zu untersuchen. Die Veränderung der Belichtungszeit hat die gleichen Auswirkungen wie eine Veränderung der Diffusionskonstante, so dass auf Variationen der Diffusionskonstante verzichtet werden kann.

3.3 Ergebnisse zum Single Molecule Tracking

Zunächst sollen nun die aus den Bilderserien gewonnenen Trajektorien betrachtet werden. Abbildung 3.1 zeigt Beispiele für Trajektorien, die unter identischen Bedingungen simuliert wurden. Aus den Trajektorien wird die mittlere quadratische Verschiebung $\langle \underline{r}^2(\tau) \rangle$ für einen Zeitabstand $\tau = T_E \varepsilon$ berechnet:

$$\langle \underline{r}^2(\tau) \rangle = \sum_{i=0}^{L_T - \varepsilon} \frac{(\underline{r}_{i+\varepsilon} - \underline{r}_i)^2}{L_T - \varepsilon} \quad (3.1)$$

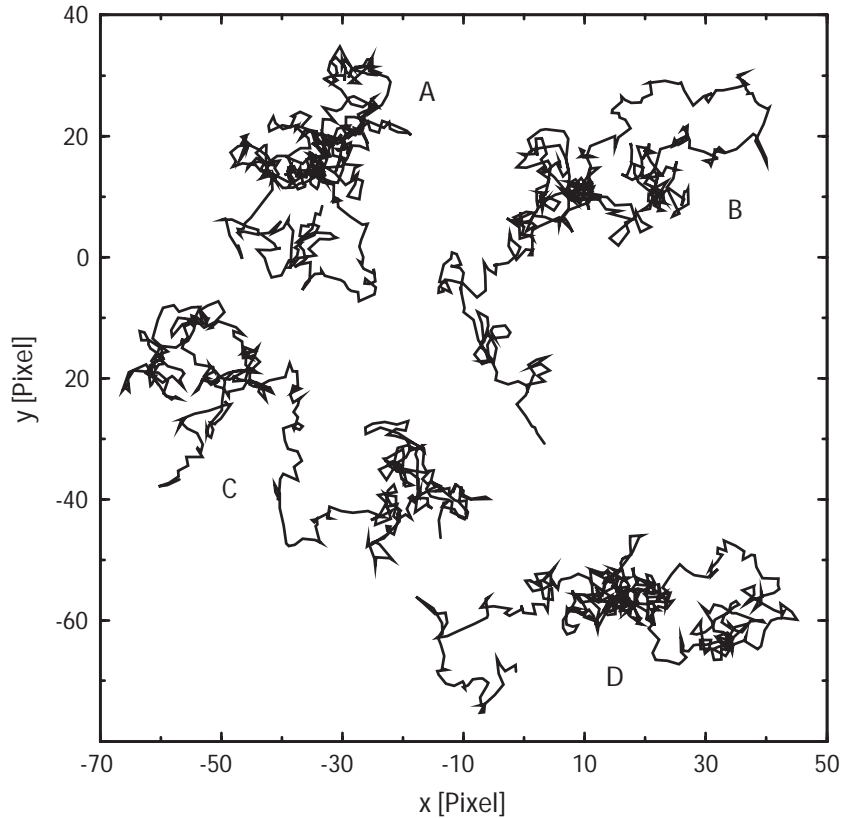


Abbildung 3.1: *Beispiele für Trajektorien aus den Computersimulationen. In der Abbildung wurde der Ursprung der einzelnen Trajektorien jeweils so verschoben, dass sich die einzelnen Trajektorien nicht kreuzen.*

Mit ε wird wiederum der dimensionslose Zeitabstand, also der Abstand der Stützpunkte für die Berechnung des MSD auf der Indexskala, bezeichnet. In Abbildung 3.2 ist $\langle \underline{r}^2(\tau) \rangle$ für die in Abbildung 3.1 gezeigten Trajektorien dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Daten insbesondere für große τ deutlich von dem erwarteten linearen Zusammenhang

$$\langle \underline{r}^2(\tau) \rangle = 4D_{KG}\tau \quad (3.2)$$

abweichen.

Die Ursache für diese Abweichungen liegt in der endlichen Länge der Trajektorien, da der lineare Zusammenhang nur im Limes $L_T \rightarrow \infty$ gilt. Ebenso ist auch der Diffusionskoeffizient nur in diesem Limes definiert. Dem Verlauf von $\langle \underline{r}^2(\tau) \rangle$ kann also nur näherungsweise ein Diffusionskoeffizient D zugeordnet werden.

Dazu wird eine lineare Regression der Daten durchgeführt, wobei die einzelnen Punkte unterschiedlich gewichtet werden, da sie eine unterschiedliche statistische

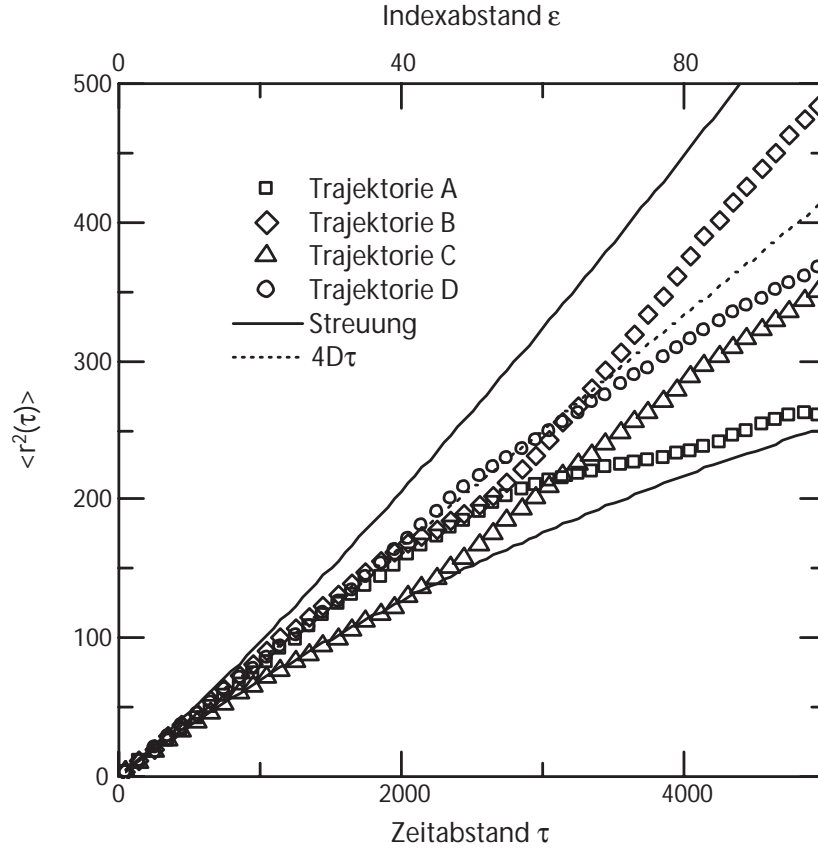


Abbildung 3.2: MSD für einige Trajektorien. Zusätzlich sind die Fehlergrenzen (Streuung, durchgezogene Linien) und der Verlauf von $4D\tau$ eingezeichnet (Beleuchtungszeit $T_E = 50$, Trajektorienlänge $L_T = 500$).

Signifikanz haben [113]. So ist z.B. $\langle \underline{r}^2(T_E) \rangle$ das Ergebnis einer Mittelung über $L_T - 1$ Punkte der Trajektorie, für die Berechnung von $\langle \underline{r}^2(T_E L_T/2) \rangle$ wird nur noch über $L_T/2$ Punkte gemittelt, so dass der letztere Wert bereits wesentlich schlechter bestimmt ist. Ein geeignetes statistisches Gewicht ist das Inverse der Varianz der Werte von $\langle \underline{r}^2(\tau) \rangle$ für ein festes τ entsprechend Gleichung 2.45 [113]. Die Abbildungen 3.3 und 3.4 zeigen den Verlauf des statistischen Gewichts $w(\tau) = 1/\text{Var}(\langle \underline{r}^2(\tau) \rangle)$ und der Streuung $\sigma = \sqrt{\text{Var}(\langle \underline{r}^2(\tau) \rangle)}$ in Abhängigkeit von der Trajektorienlänge L_T . Es wird deutlich, dass w mit zunehmendem Zeitabstand τ sehr schnell abfällt, so dass in die Berechnung von D tatsächlich überwiegend die Werte von $\langle \underline{r}^2(\tau) \rangle$ für kleine τ eingehen.

Die Verteilungen der mittels gewichteter und ungewichteter linearer Regression ermittelten Werte von $D^* = (D - \overline{D})/\overline{D}$ sind in Abbildung 3.5 wiedergegeben

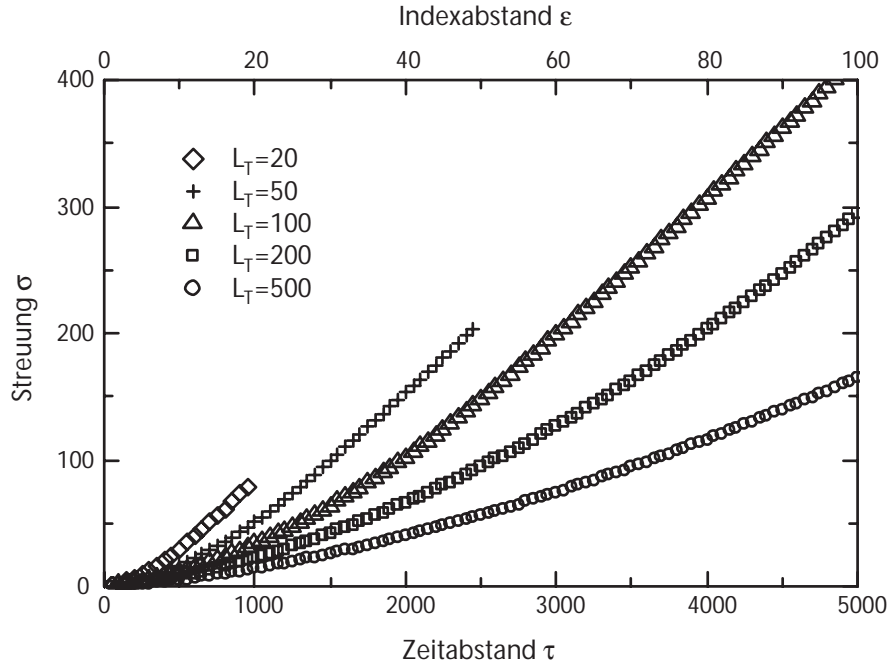


Abbildung 3.3: Verlauf der Streuung für unterschiedliche Werte der Trajektorienlänge L_T .

(\overline{D} bezeichnet das Mittel des Diffusionskoeffizienten über N_T Trajektorien). Dazu wurden gewichtete und ungewichtete lineare Regressionen der Funktion $\langle x^2(\tau) \rangle$ für 500 simulierte Trajektorien durchgeführt. Die Wichtung führt dazu, dass die Werte von D^* schnell konvergieren und somit kein willkürliches Abbruchkriterium nötig ist, um zu entscheiden, welche Punkte von $\langle x^2(\tau) \rangle$ noch berücksichtigt werden sollen. Ferner wird deutlich, dass die Verteilung der resultierenden Diffusionskoeffizienten D^* im Falle ungewichteter Regression deutlich schmaler ist, als bei ungewichteter Regression. Beide Verteilungen lassen sich durch eine Gamma-Verteilung

$$p(D) = \frac{N_l}{\overline{D} \Gamma(N_l)} \left(\frac{DN_l}{\overline{D}} \right)^{N_l-1} \exp \left(-\frac{DN_l}{\overline{D}} \right) \quad (3.3)$$

mit den Werten $N_l = 19$ ($N_l = 2$) für die Ergebnisse der gewichteten (ungewichteten) Anpassung beschreiben. Der Parameter $N_l = L_T/\varepsilon_{eff}$ kann dabei als effektive Zahl der unabhängigen Segmente interpretiert werden, über die bei der Berechnung von $\langle x^2(\varepsilon_{eff}) \rangle$ mit einem effektiven Indexabstand ε_{eff} gemittelt wird, da zur Berechnung von D unterschiedliche Werte von ε mit unterschiedlichem Gewicht beitragen (siehe auch Abschnitt 2.4.2 und [113]). Für den ungewichteten

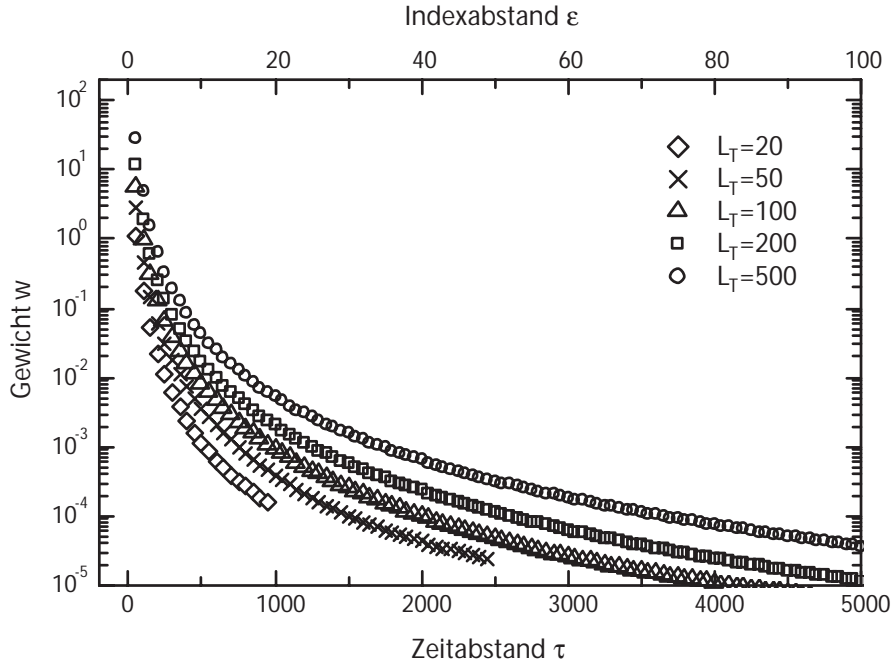


Abbildung 3.4: Verlauf der Gewichtsfunktion $w(t)$ für unterschiedliche Werte der Trajektorienlänge L_T .

Fit ergibt sich $\varepsilon_{eff} = 25$, für den gewichteten Fit dagegen $\varepsilon_{eff} = 2.6$. Die Beschreibung der Verteilung $p(D)$ durch Glg. 3.3 kann nun benutzt werden, um diese mit experimentell ermittelten Werten zu vergleichen. Die Verteilung $p(D)$ kann auch als eine Gerätefunktion oder Fehlerfunktion interpretiert werden. Eine beobachtete Verteilung von Diffusionskoeffizienten $p_{Obs}(D)$ entsteht dann als Faltung der tatsächlich im untersuchten System vorhandenen Verteilung von Diffusionskoeffizienten $p_{Real}(D)$ mit $p(D)$.

Betrachtet man nun die Verteilungen (Abbildung 3.6) der Werte von D^* für viele Realisierungen der Trajektorien ($N_T = 500$) und unterschiedliche Längen der Trajektorien ($L_T = 50, 100, 200, 500$), zeigt sich, dass die Breite der Verteilungen mit abnehmender Länge der Trajektorien zunimmt. Entscheidend für die Bestimmung eines guten Näherungswertes D für die Diffusionskonstante D_{KG} ist also die Anzahl der Punkte über die bei der Berechnung von $\langle x^2(\tau) \rangle$ gemittelt wird, also die Länge der Trajektorie. Für sehr kurze Trajektorien kann die aus $\langle x^2(\tau) \rangle$ ermittelte Diffusionskonstante erheblich von der tatsächlichen Diffusionskonstante abweichen. Damit hat der ermittelte Diffusionskoeffizient D für eine einzelne kurze Trajektorie nur beschränkte Aussagekraft. Um zu einer aussage-

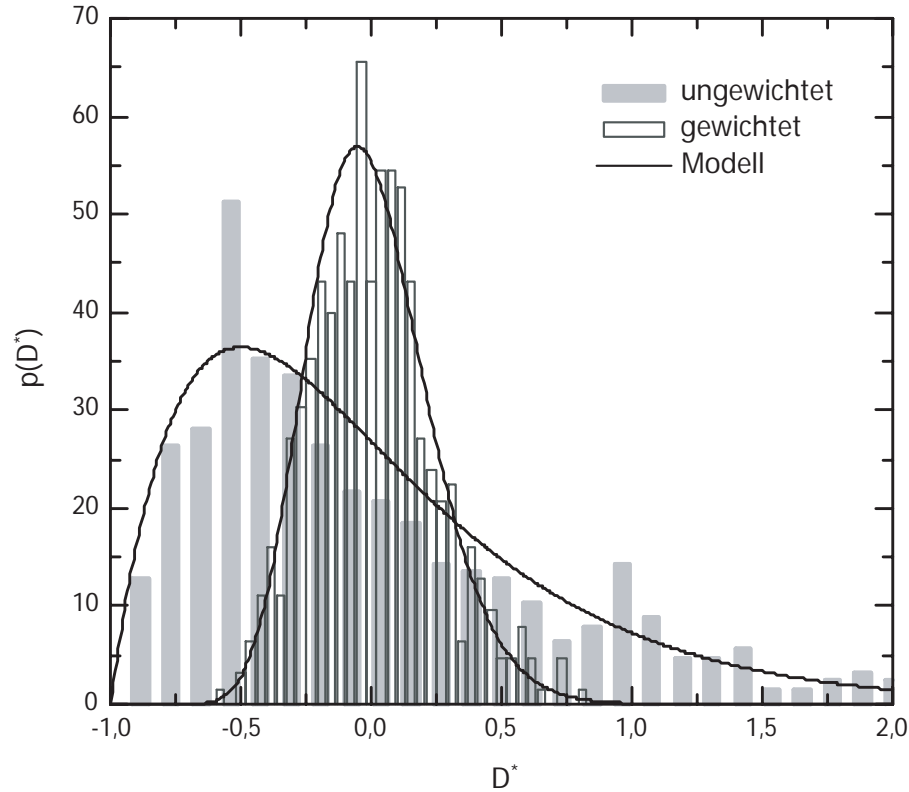


Abbildung 3.5: Vergleich der Ergebnisse der gewichteten und ungewichteten linearen Regression für 500 Trajektorien der Länge $L_T = 50$. Die durchgezogenen Linien geben Anpassungen an das im Text besprochene Modell wieder.

kräftigen Bestimmung des Diffusionskoeffizienten zu gelangen, ist es also nötig, sehr lange Trajektorien aufzuzeichnen oder über viele Trajektorien zu mitteln. Insbesondere ist es nötig, die Verteilung $p(D)$ für die Bestimmung von D zu kennen, wenn es darum geht, Aussagen darüber zu treffen, ob eine im Experiment gemessene Verteilung von Diffusionskonstanten im Bereich der statistisch bedingten Schwankungen liegt, oder ob sie das Ergebnis von Heterogenitäten im experimentell untersuchten System ist.

3.4 Spotgrößenanalyse

Der Prozess der Entstehung von Bildern diffundierender Moleküle auf einer CCD-Kamera mittels eines Weitfeldmikroskops kann für jeden Zeitpunkt während der Bildaufnahme als Abbildung eines beugungslimitierten Spots, ausgehend von der

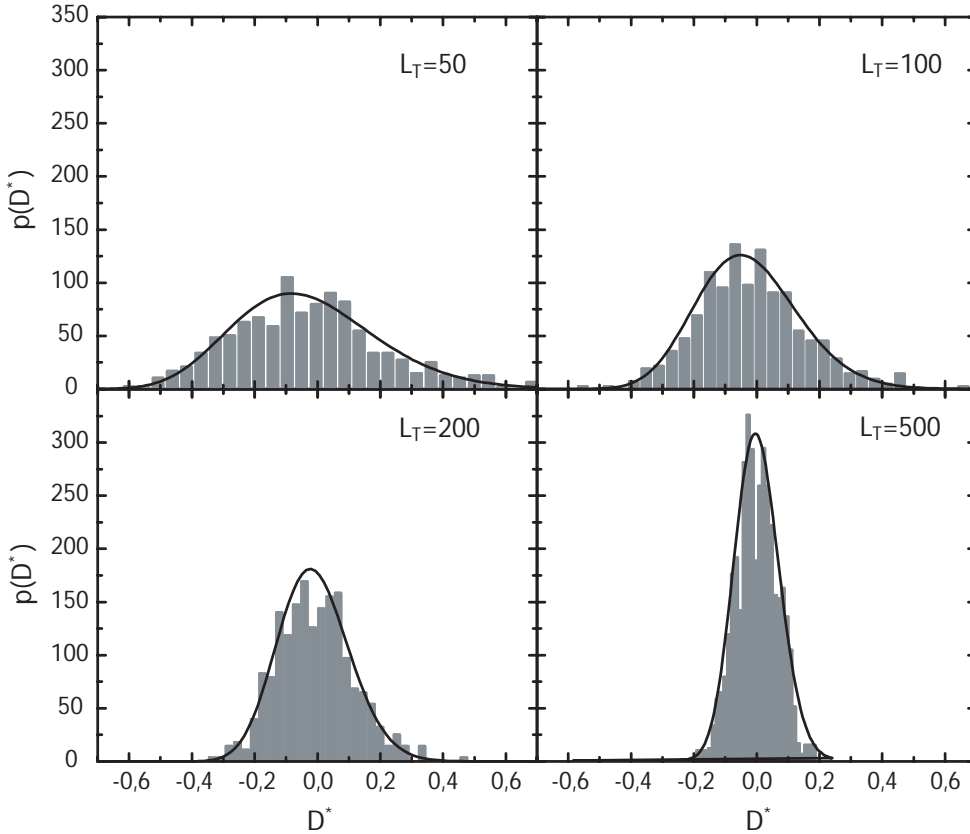


Abbildung 3.6: Verteilung der Diffusionskonstanten D^* für jeweils 500 Trajektorien (für $L_T = 500$ nur 100 Trajektorien). Die durchgezogenen Linien geben die Verteilungen entsprechend Gleichung 3.3 mit $N_l = L_T/2.6$ wieder.

aktuellen Position des Moleküls auf die Kamera, betrachtet werden. Unter der Annahme, dass sich die Intensität des Moleküls über die Zeit nicht ändert, kann somit der Bildentstehungsprozess auch als Faltung der räumlichen Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Teilchens mit der PSF interpretiert werden.

Für einen normalen zweidimensionalen Diffusionsprozess und unter der Annahme, dass sich das Teilchen zum Zeitpunkt $t = 0$ am Ort $\underline{r} = \underline{r}_0$ befindet, kann die bedingte Wahrscheinlichkeitsdichte $p(r|T_E)$ für die Wahrscheinlichkeit, das Teilchen im Zeitintervall $[0, T_E]$ in einer Entfernung $r = |\underline{r} - \underline{r}_0|$ vom Ausgangspunkt zu finden, aus der Wahrscheinlichkeitsdichte $p(r, T)$ gemäß Gleichung 2.13 durch Integration über die Zeit T gewonnen werden:

$$p(r|T_E) = \int_{t=0}^{t=T_E} \frac{1}{4\pi Dt} \exp\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right) dt \quad (3.4)$$

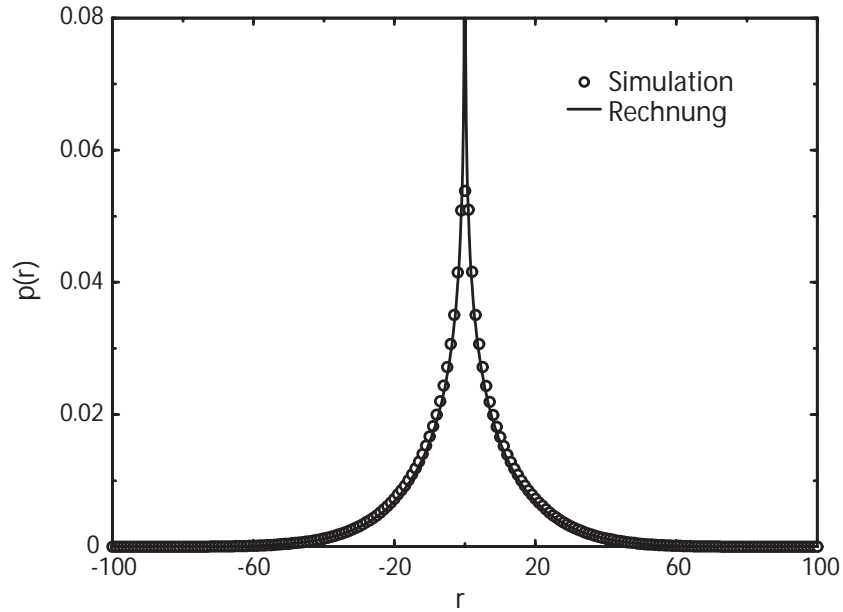


Abbildung 3.7: *Bedingte Wahrscheinlichkeitsverteilung $p(r|T_E)$ für einen zweidimensionalen Diffusionsprozess. Numerische Lösung des Integrals (Glg. 3.4, durchgezogene Kurve) und Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsverteilung aus Random Walk Simulationen (Kreise).*

Das Integral kann analytisch nicht berechnet werden, numerische Lösungen sind in Abbildung 3.7 gezeigt. Misst man die Breite

$$\sigma_D = \int r^2 p(r|T_E) dr \quad (3.5)$$

als Integral der Verteilung $p(r|T_E)$ über alle r für verschiedene Werte von D und T_E , ergibt sich im Falle zweidimensionaler Diffusion stets der Zusammenhang:

$$\sigma_D^2 = D T_E \quad (3.6)$$

Wird nun diese Wahrscheinlichkeitsdichte mit der Übertragungsfunktion des Mikroskops, die hier wieder als Gaußfunktion mit der Breite σ_G angenommen wird, gefaltet, addieren sich die Quadrate der Breiten σ_D und σ_G gemäß:

$$\sigma_S^2 = \sigma_D^2 + \sigma_G^2 \quad (3.7)$$

Dieser Zusammenhang wird anschaulich klar, wenn man das Integral in Gleichung

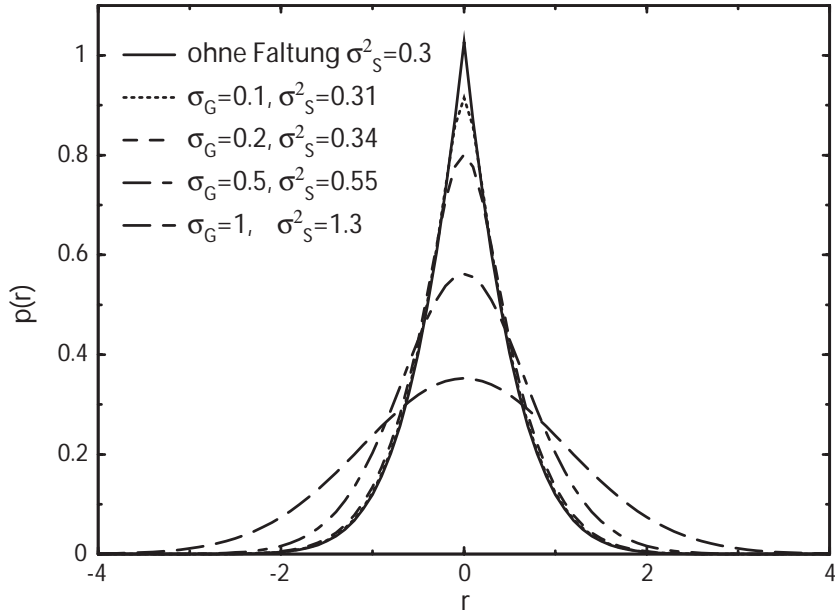


Abbildung 3.8: *Faltung der Wahrscheinlichkeitsdichte $p(r|T_E)$ mit einer Breite von $\sigma_D^2 = 0.3$ (durchgezogene Linie) mit Gaußfunktionen unterschiedlicher Breite.*

3.4 als Limes der Summe einzelner Gaußfunktionen interpretiert. In Abbildung 3.8 ist die Faltung der Wahrscheinlichkeitsverteilung mit Gaußfunktionen verschiedener Breite und die Breite der resultierenden Verteilung dargestellt. Für den Fall sehr langsamer Diffusion ($\sigma_G \gg DT_E$) geht die resultierende Intensitätsverteilung in eine Gaußverteilung mit der Breite σ_G über. Mittels der Gleichungen 3.6 und 3.7 könnte also aus einer gemessenen Spotbreite des diffusionsverbreiterten Spots bei bekannter Gaußbreite und Belichtungszeit die Diffusionskonstante D berechnet werden.

Diese Überlegungen für die räumliche Wahrscheinlichkeitsdichte gelten nur im Ensemblemittel, also für den Fall der Diffusion vieler Teilchen die anfänglich an einem Ort konzentriert sind. Betrachtet man eine einzelne Diffusionstrajektorie, so handelt es sich dabei um eine konkrete Realisierung eines Diffusionsprozesses, deren Verlauf deutlich von der mit $p(r|T_E)$ beschriebenen Verteilung abweichen kann. Erst die Mittelung über viele einzelne Trajektorien führt wieder auf die oben beschriebene Wahrscheinlichkeitsdichte $p(r|T_E)$. Die Abbilder der Trajektorien einzelner Moleküle auf eine CCD-Kamera weichen also erheblich von der oben beschriebenen radialsymmetrischen Verteilung ab, wie die Beispiele aus den

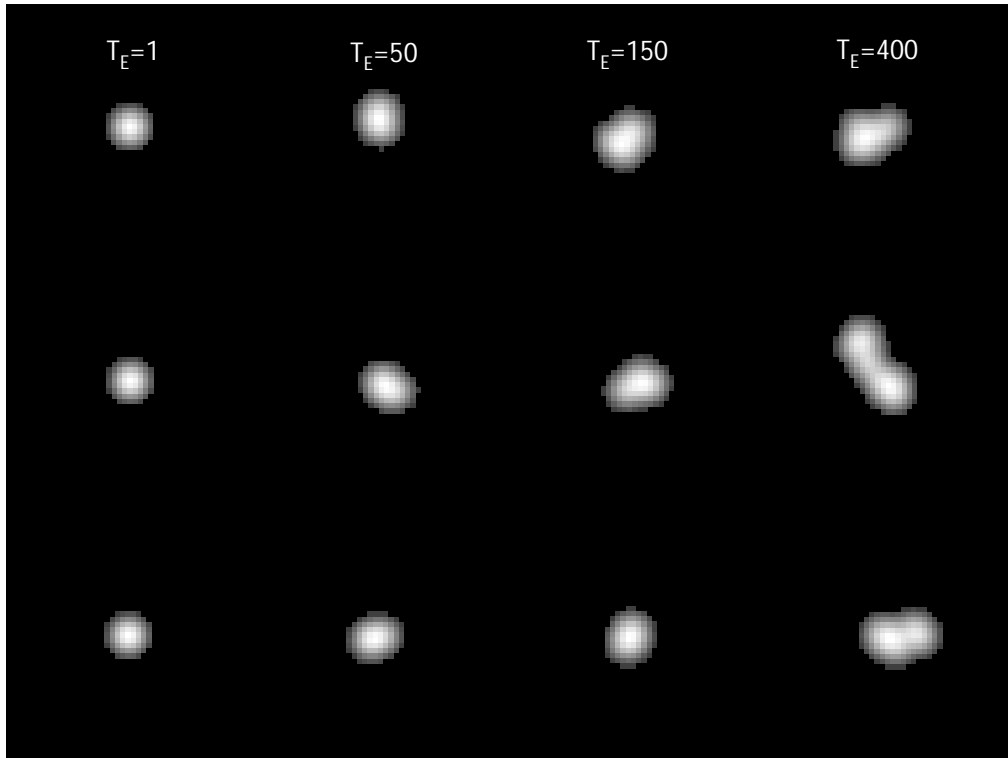


Abbildung 3.9: *Beispiele für die Form der beugungsverbreiterten Spots von einzelnen simulierten Trajektorien für unterschiedliche Belichtungszeiten (von links nach rechts). Die Graustufen kodieren die Intensität im simulierten Bild (weiß: Maximum, schwarz: keine Intensität).*

Simulationen für verschiedene Belichtungszeiten T_E in Abbildung 3.9 zeigen. Für lange Belichtungszeiten sind die Spots bereits als kurze Trajektorienabschnitte zu erkennen, die durch die Übertragungsfunktion des Mikroskops verschmiert werden.

Wie können nun aus der Verbreiterung der Spots von einzelnen Trajektorien Rückschlüsse auf den Diffusionskoeffizienten gezogen werden? Interpretiert man $\langle x^2(\tau) \rangle$ in Gleichung 2.17 als eine Fläche, die die Trajektorie mit zunehmender Zeit füllt, liegt die Idee nahe, für die hier zu analysierenden Spots ebenfalls ein Flächenmaß A zu finden, das linear mit der Belichtungszeit wächst und für sehr kurze Belichtungszeiten gegen die Fläche A_0 des beugungsverbreiterten Spots strebt:

$$A = A_0 + b D T_E \quad (3.8)$$

Ein solches Maß muss unabhängig von der beobachteten Intensität sein und sollte durch das bei der Beobachtung der Spots im Experiment unvermeidliche Rauschen nicht verfälscht werden. Die Grundfläche des Spots (gemessen als Zahl der Pixel für die die Intensität größer als Null ist) ist, erfüllt z. B. die letztgenannten Kriterien nicht.

Um die Fläche der zumeist elliptischen Spots zu bestimmen, werden zwei charakteristische Breiten σ_s und σ_l entlang der näherungsweise bestimmten Hauptachsen der Spots gemessen. Dazu wird eine Anpassung der Spots an eine zweidimensionale Gaußverteilung

$$I(\underline{r}) = I_0 \exp \left\{ -\frac{1}{2} \left[\frac{[(\underline{r} - \underline{r}_0) \times \underline{e}]^2}{\sigma_s^2} + \frac{[(\underline{r} - \underline{r}_0) \cdot \underline{e}]^2}{\sigma_l^2} \right] \right\} \quad (3.9)$$

durchgeführt. Dabei ist \underline{e} ein Einheitsvektor entlang der langen Achse des Spots, \underline{r} und \underline{r}_0 sind die Koordinaten der einzelnen Pixel bzw. des Schwerpunkts des Spots und I_0 ist ein Vorfaktor, der im Experiment der maximalen Intensität entspricht. Die in Gleichung 4.7 beschriebene Funktion stellt also eine zweidimensionale Gaußverteilung mit elliptischer Grundfläche dar. Die Anpassung wird mit einem Levenberg-Marquardt Algorithmus [115] durchgeführt. Da die Form der Spots in zunehmendem Maße von der Zielfunktion abweicht (siehe Abbildung 3.9) sind genaue Anpassungen der simulierten Spots nur für Belichtungszeiten bis ca. $T_E = 150$ möglich, für größere Belichtungszeiten wird die Qualität der Anpassungen deutlich schlechter.

Im Folgenden wird gezeigt, dass die durch $\sigma_s \sigma_l$ beschriebene Fläche ein den oben genannten Kriterien entsprechendes Flächenmaß ist. Dazu wurden, wie oben beschrieben, zahlreiche Simulationen der auf der CCD-Kamera entstehenden Abbilder einzelner diffundierender Moleküle für unterschiedliche Belichtungszeiten durchgeführt und die entstehenden Bilder an die durch Gleichung 4.7 beschriebene Funktion angepasst. Die für jeweils 50000 Bilder ermittelten Verteilungen der Spotgrößen $A = \sigma_s \sigma_l$ sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Die Verteilungen $p(A)$ haben eine stark asymmetrische Form mit deutlichen Ausläufern für große Werte von A . Das führt dazu, dass der Wert A_{max} , an dem die Verteilung maximal wird und der Mittelwert $\langle A \rangle$ der Verteilung deutlich voneinander abweichen. Die Handhabung des Mittelwertes einer Verteilung ist deutlich einfacher, da für dessen Berechnung analytische Ausdrücke existieren, so dass im

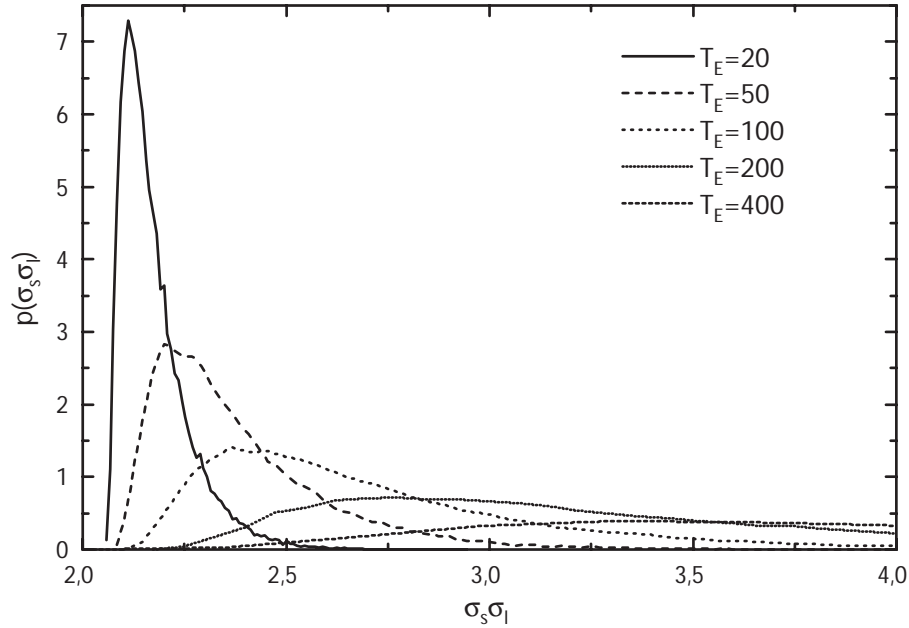


Abbildung 3.10: Verteilung der Spotgröße $A = \sigma_s \sigma_l$ für verschiedene Werte der Belichtungszeit T_E .

Folgenden Berechnungen anhand des Mittelwertes der Verteilung durchgeführt werden. Weiterhin ist zu beobachten, dass die Verteilung der Spotgrößen für längere Belichtungszeiten sehr breit wird. Eine Bestimmung der Diffusionskonstante anhand eines einzelnen Spots ist also ähnlich wie bei der Analyse von Diffusionstrajektorien endlicher Länge mit einer Unsicherheit behaftet. Die Verteilungen $p(A)$ können näherungsweise mit der Funktion

$$p(\Delta A) = \left(\frac{6}{\overline{DT}_E} \right)^2 \Delta A \exp \left(-\frac{6 \Delta A}{\overline{DT}_E} \right) \quad (3.10)$$

beschrieben werden, so dass es möglich ist, die aus Simulationen gewonnen Verteilungen mit experimentellen Daten zu vergleichen (mit $\Delta A = A - A_0$).

Zunächst soll aber untersucht werden, wie sich der Mittelwert der Verteilung $\langle A \rangle$ mit wachsender Belichtungszeit verändert. Abbildung 3.11 zeigt die Zeitabhängigkeit der aus den Verteilungen in Abbildung 3.10 ermittelten mittleren Spotgrößen $\langle A \rangle (T_E)$. Diese Größe zeigt eine lineare Abhängigkeit von der Belichtungszeit entsprechend Gleichung 3.8 mit den Werten $b = 0.33$ und $A_0 = 2.04$, wobei A_0 die Fläche des beugungsbegrenzten Spots, gemessen auf dem Kamergitter, ist.

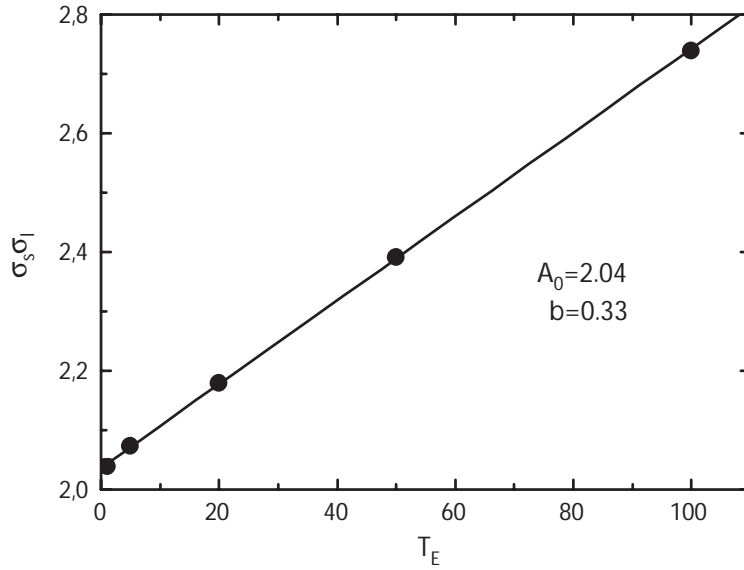


Abbildung 3.11: Zeitabhängigkeit der mittleren Spotgröße $\langle A \rangle$ (Kreise). Die durchgezogene Linie zeigt Ergebnisse der linearen Regression an die Funktion $A = A_0 + b D T_E$ mit den im Bild angegebenen Werten.

Mit den Werten für b und A_0 ist es möglich, aus

$$D = \frac{A - A_0}{b T_E} \quad (3.11)$$

näherungsweise Diffusionskonstanten D zu berechnen. Die so aus den Verteilungen der Spotgrößen in Abbildung 3.10 berechneten Verteilungen von D sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Wie erwartet, fallen nach dieser Umrechnung alle Verteilungen auf eine universelle Verteilungsfunktion, die nicht mehr von der konkreten Belichtungszeit T_E abhängig ist. Damit ist es prinzipiell möglich, den so ermittelten Spotgrößen näherungsweise einen wahrscheinlichen Wert der Diffusionskonstante zuzuweisen. Es ist aber noch zu überprüfen, mit welcher Unsicherheit diese Zuweisung verbunden ist.

Betrachtet man die aus der Analyse einzelner Bilder resultierenden Diffusionskonstante, so ist in Tabelle 3.1 angegeben, welcher Anteil der Ergebnisse jeweils in ein bestimmtes Unsicherheitsintervall $D \pm \Delta D$ fällt. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich für die Bestimmung der Diffusionskonstante aus einem einzelnen Bild eine sehr große Unsicherheit ergibt.

Die Situation verbessert sich deutlich, wenn man die Ergebnisse über mehrere

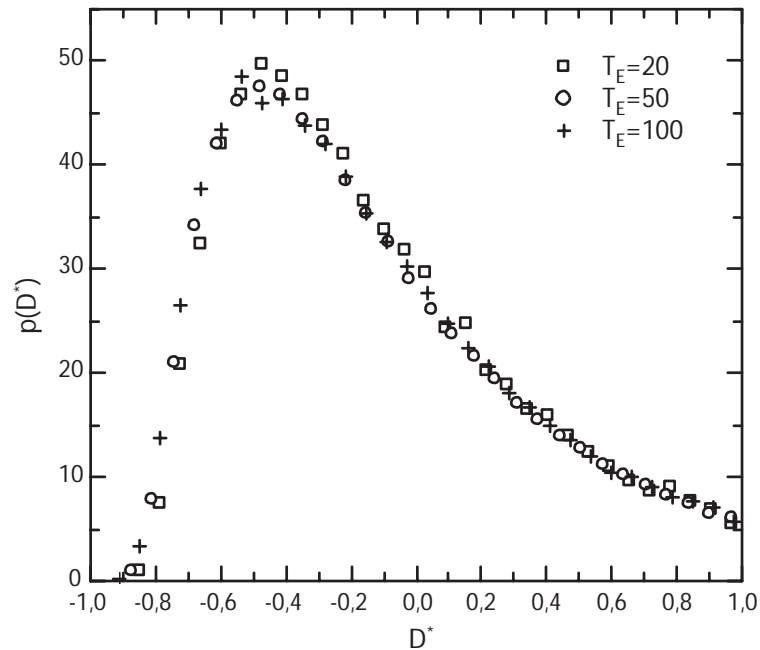


Abbildung 3.12: Aus den Spotgrößen A berechnete Verteilung der Diffusionskonstanten D^* für verschiedene Werte von T_E .

Einzelbilder mittelt. Bereits eine Mittelung über nur fünf Bilder führt zu einer deutlichen Verbesserung, wie in Abbildung 3.13 ersichtlich wird. Damit erreicht man bei der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten bereits eine Genauigkeit, die der Genauigkeit der Berechnung des Diffusionskoeffizienten aus dem MSD für Trajektorien der Länge $L_T = 50$ entspricht. Mittelungen über eine größere Anzahl von Bildern führen nochmals zu einer deutlichen Verbesserung. Mittelt man z.B. über alle 50 Bilder einer Trajektorie der Länge $L_T = 50$ erreicht man eine deutliche Verringerung der Streuung der ermittelten Werte von D , verglichen mit den Ergebnissen der Trajektorienanalyse durch Berechnung der mittleren quadratischen Verschiebung (Abbildung 3.13).

Zusammenfassend ergibt sich also folgende Situation: Die Berechnung einer Diffusionskonstante aus einem einzelnen Bild ist mit einer großen Unsicherheit verbunden. Mittelt man aber über die Spotgrößen aufeinanderfolgender Bilder

$\Delta D/D$	0.1	0.2	0.5	1.0	1.5	2.0
Anteil	0.125	0.25	0.66	0.92	0.97	0.99

Tabelle 3.1: Unsicherheit bei der Bestimmung der Diffusionskonstante D .

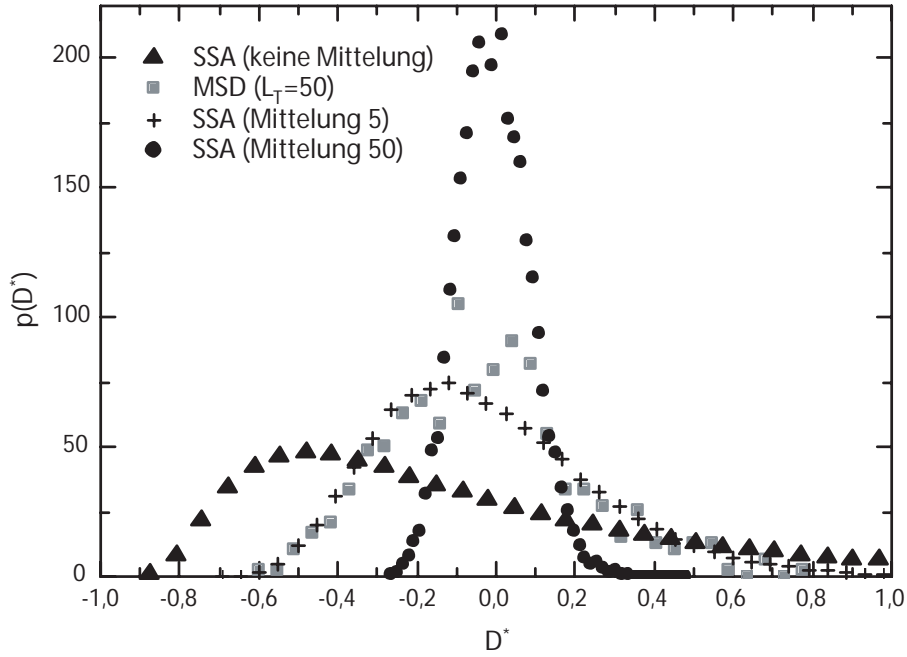


Abbildung 3.13: Verteilung der aus den Spotgrößen A ermittelten Diffusionskonstanten D^* (ohne Mittelung: Dreiecke, Mittelung über 5 Bilder: Kreuze, Mittelung über 50 Bilder: Kreise), verglichen mit den aus dem MSD berechneten Werten ($L_T = 50$, Quadrate).

(die zusammen eine Diffusionstrajektorie ergeben), kann man auf diese Weise deutlich genauer eine Diffusionskonstante bestimmen als durch Analyse der mittleren quadratischen Verschiebung. Ebenso ist es möglich, Bilder mehrerer Moleküle gleichzeitig in einem Bild aufzunehmen. Unter der Annahme, dass alle diese Moleküle gleiche Diffusionseigenschaften haben, kann dann durch Mittelung über die Spotgrößen der einzelnen Moleküle ebenfalls die Diffusionskonstante mit hoher Genauigkeit bestimmt werden.

Damit kann also mit einer einzigen CCD-Kamera-Belichtung eine Messung der Diffusionskonstante durchgeführt werden. Im Gegensatz zum Single Molecule Tracking ist man nicht mehr auf Kameras beschränkt, die in schneller Folge Bilder aufnehmen können, sondern man kann Diffusionsanalysen auch mit den häufig in den Labors vorhandenen und deutlich preiswerteren Slow-Scan-CCDs durchführen, die eine geringere Auslesegeschwindigkeit aufweisen. Die Spotgrößenanalyse bietet also gegenüber der konventionellen Diffusionsanalyse mittels Single-Molecule-Tracking durch die höhere statistische Genauigkeit und die erheblich vereinfachten Einsatzmöglichkeiten deutliche Vorteile. Darüber hinaus

erlaubt es die Spotgrößenanalyse, zeitliche Änderungen der Diffusionskonstante instantan zu detektieren, was mit den etablierten Techniken der Diffusionsanalyse nicht möglich ist.

Kapitel 4

Experimentelles

Dieses Kapitel befasst sich mit der Beschreibung und Charakterisierung der experimentellen Aufbauten und der Präparation und Charakterisierung der verwendeten Proben. Weiterhin werden die Methoden zur Analyse und Aufbereitung der experimentellen Daten beschrieben.

4.1 Experimentelle Aufbauten

4.1.1 Konfokalmikroskop für die Fluoreszenzburstanalyse

Die Fluoreszenzburstanalyse basiert auf der konfokalen Mikroskopie. Die im Kapitel 5 beschriebenen Experimente wurden an einem Konfokalmikroskop durchgeführt, das speziell für die zu untersuchenden Fragestellungen aufgebaut und optimiert wurde. Mittels einer piezoelektrischen Motorisierung des Probenhalters kann das Konfokalmikroskop auch für abbildende Konfokalmikroskopie eingesetzt werden, so dass es möglich ist, sowohl die verwendeten Proben, als auch das Mikroskop selbst, sorgfältig zu charakterisieren.

Der Aufbau des Konfokalmikroskops ist detailliert in Abbildung 4.1 gezeigt. Der Anregungslaser (Argon-Ionen-Laser, Coherent Innova 310) befindet sich auf einem separaten Tisch. Der Multimode-Laserstrahl wird über ein Prisma in seine spektralen Komponenten zerlegt und die 514.5 nm Linie mittels einer Faserkoppeleinheit (Newport M-F-916T, 40x-Objektiv) in eine Single-Mode-Glasfaser (Fibercore SM 600) eingekoppelt und auf den Mikroskoptisch geführt¹. Mittels eines

¹Damit ist der Mikroskoptisch von Schwingungen des Lasers (z.B. durch Kühlwasser) ent-

weiteren Faserkopplers (Newport M-F-916T, 12x-Objektiv) wird aus der Glasfaser auf dem Mikroskoptisch ein Parallelstrahl mit einem Durchmesser von ca. 5 mm ausgekoppelt. Die Parallelität des Strahls wird durch Abbildung (über mehrere Spiegel) auf einen ca. 10 m entfernten Schirm sorgfältig justiert. Um das Anregungslicht spektral zu filtern, wird ein Bandpassfilter (Laser Components LCS 10-515-A, Halbwertsbreite 10 nm) eingesetzt. Über einen Strahlteiler (LINOS Photonics, Quartz, Dicke 8 mm, einseitig antireflexbeschichtet ARB 2) wird das Anregungslicht auf die Eintrittspupille des Objektivs (Zeiss, 100x, 1.3 NA, Ölimersion) abgebildet. Dabei wird der Anregungsstrahl so justiert, dass er sowohl zentral als auch senkrecht auf die Eintrittspupille des Objektivs fällt². Damit ist sichergestellt, dass Anregungs- und Detektionsfokus des Objektivs übereinstimmen³.

Die Lage des Detektionsstrahlengangs ist damit ebenfalls festgelegt. Um das Anregungslicht sowie Streulicht vom zu detektierenden Fluoreszenzlicht zu trennen, kommt ein holographisches Notch-Filter (Kaiser, HNF 514.5-1.0) zum Einsatz. Mittels einer langbrennweitigen Linse (Achromat, 250 mm, Edmund Scientific) wird das Fluoreszenzlicht auf ein justierbares Pinhole (0.15 mm Durchmesser) abgebildet, das für eine zusätzliche räumliche Filterung in axialer Richtung sorgt. Detektiert wird das Fluoreszenzlicht mittels eines Photomultipliers (Thorn-EMI, S20 Photokathode), der unmittelbar hinter dem Pinhole angeordnet ist⁴.

Die zu untersuchende Probe befindet sich auf der Rückseite eines Deckglases, das mittels einer Probenhalterung auf einem piezoelektrischen 3D-Probenscanner (Tritor 3D-100, Piezosystems Jena) mit einem Scanbereich von 0.1 mm in allen Raumrichtungen befestigt ist. Die Steuerung des Scanners und die Erfassung der Signale des Photomultipliers erfolgt durch einen PC mit Hilfe selbst entwickelter

koppelt. Bei dem Mikroskoptisch handelt es sich um einen Eigenbau. Eine auf eine schwere Steinplatte montierte Aluminium-Lochrasterplatte trägt die optischen Komponenten, die Steinplatte ist mittels Gummiseilen an der Decke des Labors aufgehängt und somit weitgehend von mechanischen Schwingungen isoliert.

²Als Justierhilfe wird deshalb an Stelle des Objektivs ein Spiegel eingesetzt und überprüft, dass der Anregungsstrahl in sich selbst zurückreflektiert wird. Ferner ist es für die Justage erforderlich, mindestens einen Spiegel mit Feinjustagemöglichkeiten (Verkippen) im Anregungsstrahl zu haben sowie in die Halterung des Strahlteilers ebenfalls Justagemöglichkeiten einzubauen.

³Eine Feinabstimmung erreicht man durch eine Nachjustage mittels fluoreszierender Testobjekte, z.B. Fluospheres (282 nm, Nile Red, Molecular Probes L-5248).

⁴Die Grobjustage des Detektionsstrahlengangs erfolgt, indem der Reflektionsspot von der Oberfläche eines im Arbeitsabstand unter dem Objektiv befindlichen Deckglases verfolgt wird. Die Feinjustage erfolgt wiederum mittels fluoreszierender Testobjekte.

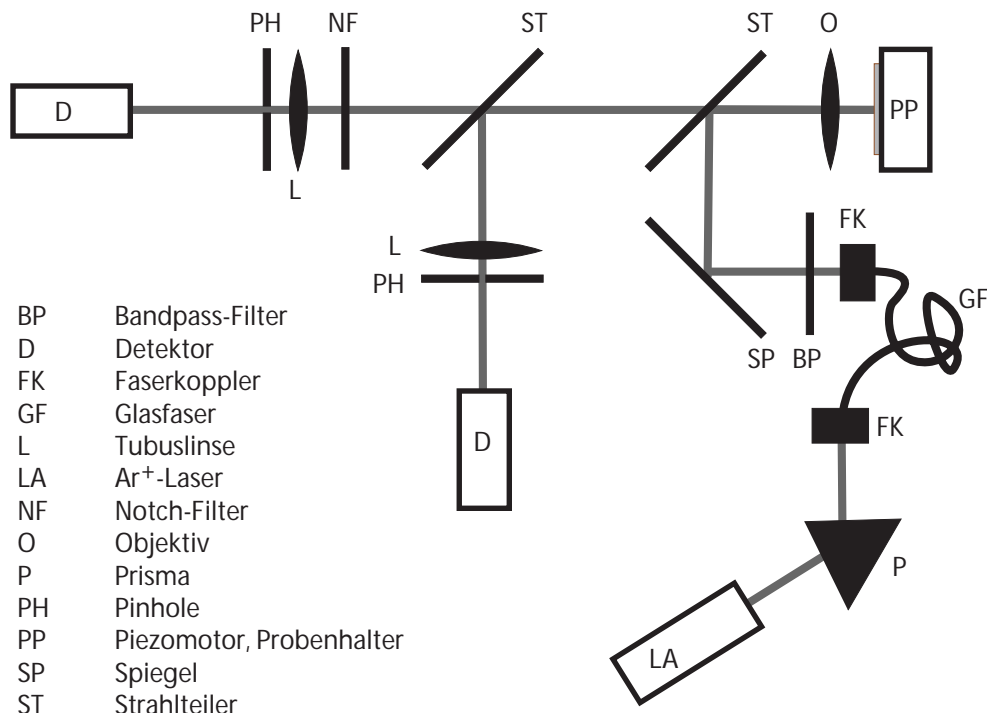


Abbildung 4.1: Strahlengang und optische Komponenten des konfokalen Mikroskops.

Software. Zeitreihen der Fluoreszenz für die Fluoreszenzburstanalyse werden mit einem ebenfalls im PC installierten Multi Channel Analyzer (Canberra) aufgezeichnet. Im bildgebenden Modus können entweder Fluoreszenzbilder oder durch Entfernen des Notch-Filters, Abbilder des von der Probe reflektierten oder gestreuten Lichts aufgezeichnet werden. Durch Einbau eines Strahlteilers im Detektionsstrahlengang und eines zusätzlichen Detektors ist es auch möglich, Bilder in beiden Kanälen simultan aufzuzeichnen.

Um das Mikroskop zu charakterisieren, wurden Bilder von fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln (Fluospheres, Molecular Probes) aufgenommen. Die daraus gewonnen Parameter (Spotradien ω_z und ω_r , jeweils bei einem Abfall der Intensität auf das $1/e$ -fache) sind für die Berechnung von Diffusionskonstanten mittels Fluoreszenzburstanalyse erforderlich.

Für die Fluoreszenzburstanalyse wurden jeweils an bestimmten Positionen innerhalb des Tropfens bzw. am Tropfenrand Zeitreihen der Fluoreszenzintensität aufgezeichnet. Für eine Einzelmessung wurden jeweils 100 Zeitreihen, bestehend aus je 8192 Punkten mit 0.5 ms Integrationszeit/Punkt aufgezeichnet. In einer

6.82 min dauernden Messung werden also 819200 Datenpunkte erfasst.

Die Experimente wurden mit Ausnahme der leistungsabhängigen Kontrollexperimente bei einer Anregungsleistung von 1 mW (gemessen an der Eintrittspupille des Objektivs) durchgeführt.

Die Detektionseffizienz für die Fluoreszenzdetektion beträgt bis zu 7 % (im Falle optimaler Justage), d. h. 7 % der von einem Farbstoffmolekül emittierten Photonen können am Detektor nachgewiesen werden.

4.1.2 Weitfeldmikroskop für die Einzelmolekülvideomikroskopie

Für die im Kapitel 6 beschriebenen Experimente wurde ein hochempfindliches Weitfeldmikroskop aufgebaut, das speziell für die Detektion einzelner Moleküle in ultradünnen Flüssigkeitsfilmen optimiert ist. Abbildung 4.2 stellt den experimentellen Aufbau detailliert dar. Das Weitfeldmikroskop befindet sich auf einem schwingungsgedämpften optischem Tisch (Newport). Der Argon-Ionen-Laser (Coherent Innova-300) ist auf einem separaten Tisch montiert, um die Einkopplung von Schwingungen des Lasers in den Mikroskop-Aufbau zu vermeiden. Die über das Prisma P1 selektierte 514.5 nm - Linie des Lasers wird in eine polarisationserhaltende Single Mode - Glasfaser (Fibercore HB 600) eingekoppelt und auf dem Mikroskoptisch mit Hilfe eines Faserkopplers (Newport M-F-916 T, 40x Objektiv) in einen Parallelstrahl (2 mm Durchmesser) ausgekoppelt. Mittels eines zusätzlichen Polarisationsfilters wird eine definierte lineare Polarisation des Laserlichts hergestellt. Eine auf einem elektrooptischem Modulator basierende Intensitätsstabilisierungseinheit (Conoptics 370 BNC) erlaubt es, Intensitätsschwankungen des Laserlichts weitgehend zu unterdrücken (verbleibende Schwankungen $< 1\%$). Das linear polarisierte Anregungslicht wird über ein $\lambda/4$ -Plättchen in zirkular polarisiertes Licht umgewandelt. Über ein Quarz-Prisma (LINOS Photonics) und einen Bandpass-Filter (Laser-Components LCS 10-515-A, Halbwertsbreite 10 nm) wird das Anregungslicht spektral gefiltert. Anschließend wird das Anregungslicht mit einem Mikroskopobjektiv unter einem Winkel von 45 Grad in ein Quarz-Prisma (LINOS Photonics) eingekoppelt, so dass der Laserstrahl an der Hypothenuse des Prismas total reflektiert wird und der Fokus des Objektivs ebenfalls an der Hypothenuse entsteht. Damit wird der Anregungsspot auf einen Durchmesser von etwa 50 μm auf der Oberfläche des

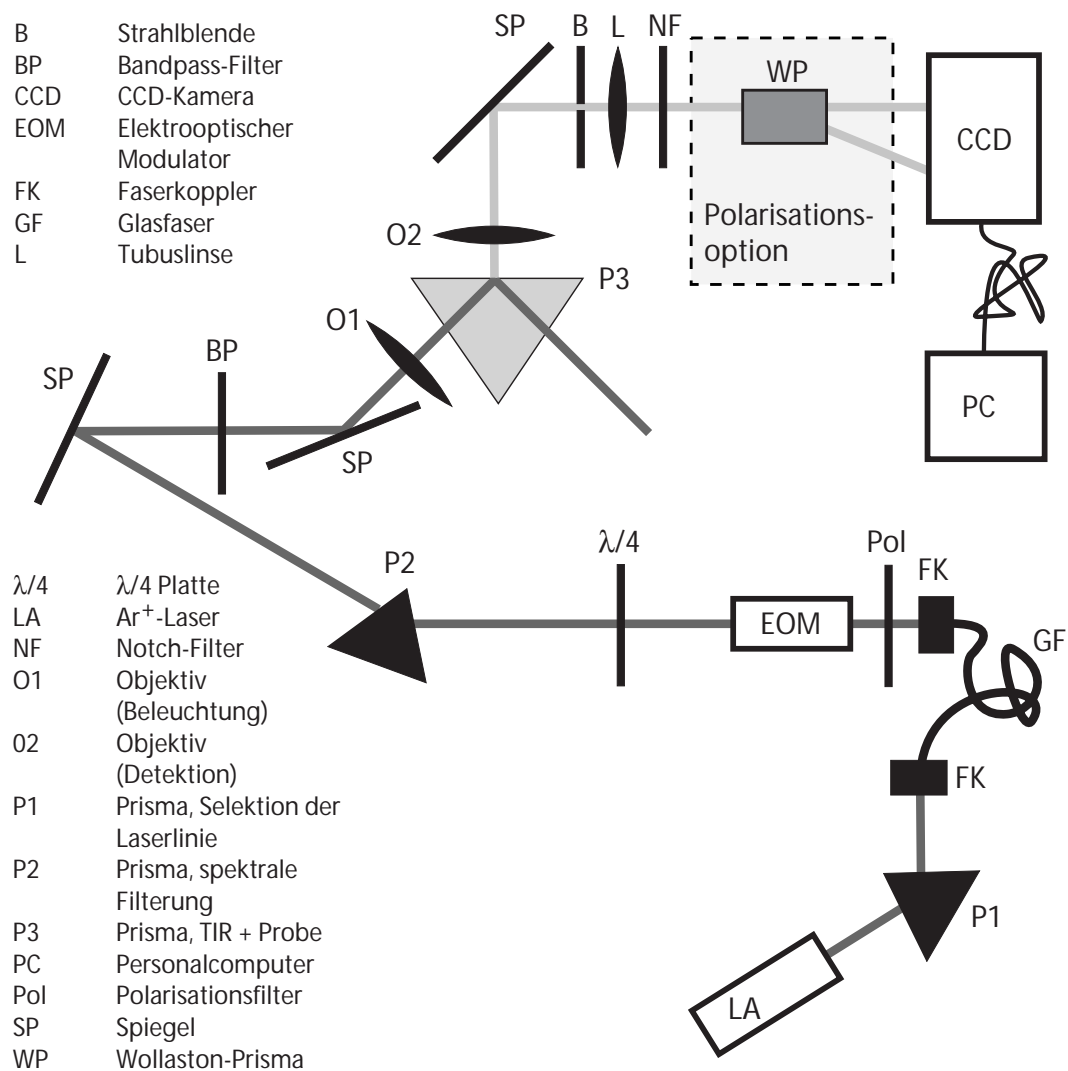


Abbildung 4.2: Aufbau des Weitfeldmikroskops.

Prismas konzentriert. Bei einer Anregungsleistung von 10 mW erreicht man so eine Anregungsintensität von ca. 0.8 kW/cm².

Auf der Oberseite des Prismas wird mittels Immersionsöl die zu untersuchende Probe fixiert. Dabei handelt es sich um ein Quarz-Deckglas (Dicke 0.13 mm) auf dessen Oberfläche sich der zu untersuchende Flüssigkeitsfilm befindet (siehe auch Abb. 2.12). Die Verwendung von Quarzgläsern erlaubt es, die Lumineszenz aus Prisma und Deckglas zu minimieren. Das Prisma mit der Probe ist auf einem xy-Verschiebetisch (Radiant Dyes) montiert, so dass das Prisma in der Ebene des optischen Tisches verschoben werden kann. Der Aufbau ist so realisiert,

dass die Oberfläche des Prismas bzw. der Probe parallel zur Tischoberfläche liegt. Befindet sich auf der Oberfläche des Prismas ein dünner Flüssigkeitsfilm, erfolgt die Totalreflexion an der Oberfläche des Flüssigkeitsfilms. Die Anregung erfolgt also hier nicht im evaneszenten Feld, das bei der Totalreflexion entsteht, sondern über propagierende Lichtwellen. Obwohl bei den hier zu untersuchenden ultradünnen Flüssigkeitsfilmen der wesentliche Vorteil einer TIR-Beleuchtung, die Selektivität auf oberflächennahe Probenbereiche, nicht zum Tragen kommt, hat diese Methode gegenüber einer Durchlicht- oder Auflichtbeleuchtung den Vorteil, dass nur sehr wenig Anregungslicht in den Detektionsstrahlengang eingekoppelt wird.

Das aus der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird mittels eines Trockenobjektivs (Zeiss Epiplan Neofluar, 100x, 0.9 NA) gesammelt und mit der Tubuslinse (Achromat, 250 mm, Edmund Scientific) auf eine intensivierte CCD Kamera (Pentamax-512EFT, Gen IV Intensifier, Princeton Instruments) abgebildet. Zur Filterung des Fluoreszenzlichts wird ein holographisches Notch-Filter (HNF 514.5-1.0, Kaiser) in den Detektionstrahlengang eingesetzt. Optional kann der Detektionsstrahlengang mit Hilfe eines Wollaston-Prismas (Quarz, Strahlseparation 2°, LINOS Photonics) in zwei Teilstrahlen mit jeweils orthogonal polarisierten Anteilen des Fluoreszenzlichts zerlegt werden, die simultan auf die CCD abgebildet werden können.

Das Objektiv ist auf einem 3-D-Positioniersystem (Flexure Stage MD 122, Elliot Martock) montiert, das eine manuelle Positionierung des Objektivs gegenüber der Probe und dem feststehenden Anregungsspot mit bis zu 10 nm Genauigkeit erlaubt. Bei der Justage des Detektionsstrahlengangs ist zu beachten, dass die optische Achse des Objektivs genau über dem Zentrum des Anregungsspot liegt, anderenfalls kommt es zu Abbildungsfehlern, da der korrigierte Bildbereich (Bildfeld) des Objektivs einen Durchmesser von nur 0.1 mm aufweist. Als Justagehilfe eignen sich auch hier wieder fluoreszenzmarkierte Latexkügelchen (Fluospheres), die bei optimaler Justage als nahezu beugungsbegrenzte Spots mit hohem Signal/Untergrund-Verhältnis (bis zu 40) abgebildet werden können. Bei der Abbildung auf die Kamera wird das Bild der Probe 100-fach vergrößert. Die Abmessungen eines Pixels auf der Kamera entsprechen dann 130 nm auf der Probe.

Die Pentamax-Kamera ist für die Detektion schwacher Signale bei sehr kur-

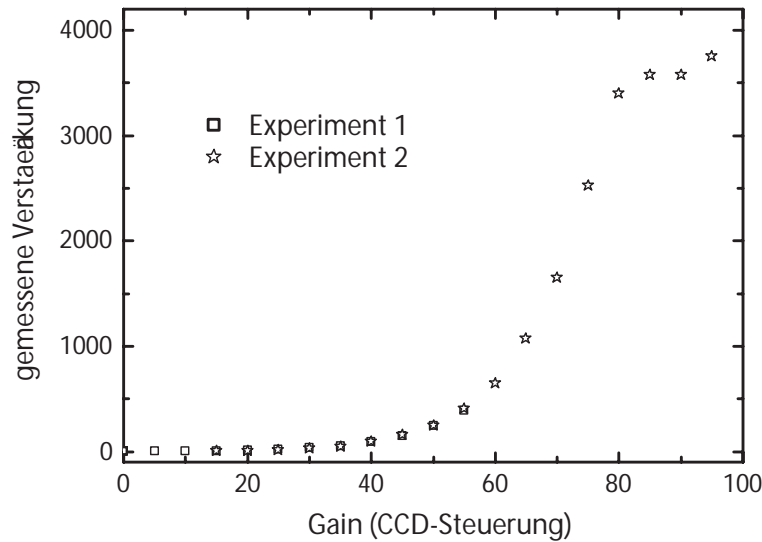


Abbildung 4.3: *Gemessene Verstärkung der detektierten Intensität in Abhängigkeit vom Gain-Parameter der Kamera. Dazu wurden in zwei Messreihen die maximalen Intensitäten bei der Abbildung von fluoreszenzmarkierten Latexkügelchen gemessen.*

zen Belichtungszeiten optimiert. Der Bildverstärker (Intensifier), der Verstärkungsfaktoren von bis zu 4000 erreicht, hat seine maximale Empfindlichkeit im Wellenlängenbereich von 550 bis 750 nm. Die Verstärkung kann durch Verändern der Hochspannung am Bildverstärker variiert werden. In Abb. 4.3 ist der Verlauf der gemessenen Verstärkung in Abhängigkeit von dem an der Kamera eingestellten Wert des Gain-Parameters wiedergegeben. Es wird deutlich, dass der Zusammenhang zwischen dem am Kamerasteuergerät eingestellten und dem tatsächlichen Wert der Verstärkung nicht linear ist. Die im folgenden beschriebenen Experimente wurden bei einer Verstärkung von 95 (Wert am Steuergerät) durchgeführt.

Der Bildverstärker ist mit einem Glasfaserbündel direkt an den CCD-Chip gekoppelt. Als Detektor kommt in der Kamera ein Frametransfer-Chip (EEV 512×512 FT) mit einer Chipfläche von $2 \times 512 \times 512$ Pixeln zum Einsatz, der thermoelektrisch auf eine Temperatur von -25°C gekühlt wird. Die einzelnen Pixel haben eine Kapazität von jeweils 4096 Photoelektronen. Wird durch zu hohe Belichtungszeiten dieser Wert überschritten, kommt es zum Überlaufen von Ladungen auf benachbarte Pixel (Blooming). Das Kamerasystem wird über einen Personalcomputer durch das vom Kamerahersteller gelieferte Programm

WINSPEC gesteuert. Mit Hilfe der Software können die Belichtungszeiten und die Auswahl des auszulesenden Bildbereichs (Region of Interest - ROI) eingestellt werden. Die Aufnahme von Bildern bzw. Bilderserien wird ebenfalls über die Software gesteuert. Mit einem Oszilloskop wurde an den Signalausgängen der CCD-Kamera das Timing von CCD-Chip und Bildverstärker überprüft. Damit wird sichergestellt, dass die durch die Software der Kamera angegebenen Belichtungs- und Auslesezeiten mit hoher Genauigkeit realisiert werden. Das Ausleserauschen der CCD-Kamera beträgt 2 bis 3 Photoelektronen (RMS, Herstellerangabe).

Die mit der Kamera erreichbaren Bildraten sind durch die Zeit, die zum Auslesen der Daten aus dem Chip benötigt wird, begrenzt. Für das Auslesen eines Bildes von 50×50 Pixeln werden 9.3 ms benötigt, ein 100×100 Pixel großes Bild benötigt 14.9 ms Auslesezeit. Die für den Transfer zwischen den beiden Teilchips (Frametransfer) benötigte Zeit liegt unter 1 ms. Entsprechend können Bilder aus 50×50 Pixeln mit Raten von bis zu 100 Bildern/s aufgezeichnet werden. Bei einer Belichtungszeit von 10 ms können im Mittel noch ca. 50 Photoelektronen / Pixel von einem einzelnen Molekül mit einem mittleren Signal/Untergrund-Verhältnis (SNR) von 6 bis 7 detektiert werden, so dass es möglich ist, auch bei diesen hohen Bildraten einzelne Moleküle zuverlässig zu beobachten. Prinzipiell können auch bei kürzeren Belichtungszeiten (bis zu 2 ms) noch einzelne Moleküle detektiert werden. Da die erzielbare Bildrate aber durch die Auslesezeit beschränkt ist, ist es in der Regel nicht sinnvoll, Belichtungszeiten zu wählen, die unterhalb der Auslesezeit liegen. Für die hier beschriebenen Experimente wurden Bildserien von 500 Bildern, bestehend aus jeweils 100×100 Pixeln, aufgezeichnet.

Zur Charakterisierung der Stabilität und der bei der Detektion erreichbaren Positionierungsgenauigkeit wurden Bilderserien von einzelnen fluoreszenzmarkierten Latexkügelchen (Fluospheres) mit unterschiedlichen Belichtungszeiten, also unterschiedlichen SNR, aufgezeichnet. Die zunächst in einer wässrigen Suspension befindlichen Latexkügelchen wurden auf Deckgläschen mit sehr geringer Flächenkonzentration präpariert und anschließend getrocknet, so dass deutlich voneinander getrennte und immobile Kügelchen zu beobachten sind. Die Auswertung der Bilderserien wurde wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben durchgeführt.

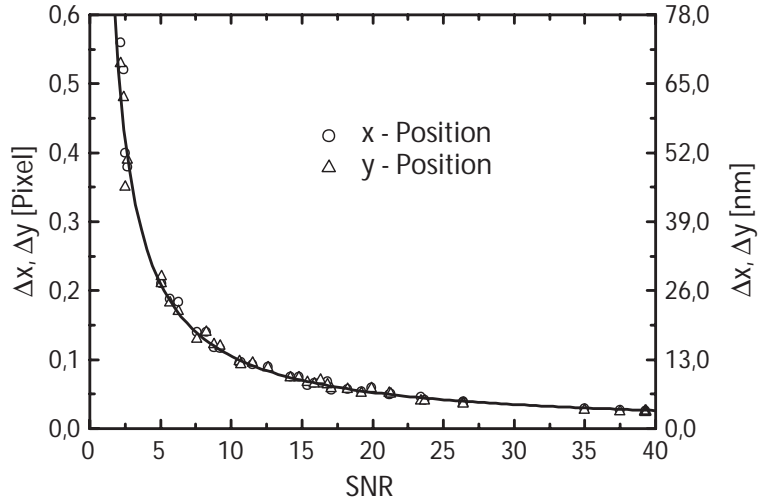


Abbildung 4.4: Streuung (Δx , Δy) bei der Bestimmung der Position immobiler Latexkugeln in Abhängigkeit vom SNR. Die durchgezogene Linie ist ein Fit an Gleichung 4.2 mit $q = 1.05$ Pixel (136.5 nm).

Das SNR wurde entsprechend

$$SNR = \frac{I_o}{\sqrt{\sigma_{bg}^2 + \sigma_{I_o}^2}} \quad (4.1)$$

aus der über alle Bilder einer Serie gemittelten maximalen Intensität I_o , deren Streuung σ_{I_o} und der Streuung der Intensität des Untergrunds σ_{bg} berechnet. Abbildung 4.4 zeigt die Streuung bei der Bestimmung der Position der Kugeln in Abhängigkeit vom SNR. Die Daten stimmen sehr gut mit der in Abschnitt 2.4.2 diskutierten Formel

$$\Delta x_i = q/SNR \quad (4.2)$$

überein (mit $q = 1.05$ Pixel). Damit wird deutlich, dass selbst bei geringen Werten des SNR noch eine Positionierungsgenauigkeit erreichbar ist, die mit maximal 50 nm (bei $SNR = 2$) sowohl deutlich unter der Auflösungsgrenze des Mikroskops (≈ 350 nm) als auch deutlich unter der Abmessung eines Pixels liegt. Bei hohen Werten des SNR werden Positionierungsgenauigkeiten deutlich unter 10 nm erreicht. Damit kann sichergestellt werden, dass einzelne Partikel mit sehr hoher Genauigkeit lokalisiert werden können und so auch in den Einzelmolekülexperimenten zuverlässig zwischen mobilen und immobilen Molekülen unterschieden werden kann. Allerdings ist zu beachten, dass bei der Abbildung diffundierender

Moleküle sicherlich nicht die maximale Positionierungsgenauigkeit erreicht wird, da es durch die Spotverbreiterung, die durch die Diffusionsbewegung verursacht wird, auch zu Abweichungen von der, für die Berechnung der Positionierungsgenauigkeit vorausgesetzten, gaußförmigen Intensitätsverteilung der Spots kommt.

Bei sehr langen Belichtungszeiten (Belichtungszeit 1s, Dauer der gesamten Messung: 8.3 min) wurde eine Drift der Position der immobilen Latexkügelchen von bis zu einem Pixel über die gesamte Messung beobachtet, die auf mechanische Instabilitäten des Aufbaus zurückzuführen ist. Die im Folgenden beschriebenen Experimente laufen auf wesentlich kleineren Zeitskalen (< 30 s) ab, so dass Einflüsse einer Drift des Aufbaus auf die beobachteten Trajektorien vernachlässigt werden können.

4.2 Probenpräparation und -charakterisierung

4.2.1 Proben für die Fluoreszenzburstanalyse

Für die Fluoreszenzburstanalyse wurden kleine Flüssigkeitströpfchen auf einem Quarz-Deckglas (Suprasil, Vogelsberger Quarzglasstechnik) deponiert. Als Modellflüssigkeit wurde Ethylenglykol (spektroskopischer Grad, Aldrich, $\eta = 16.79$ mPas [116]) ausgewählt. Referenzexperimente wurden ebenfalls an Wasser (spektroskopischer Grad, Aldrich, $\eta = 0.89$ mPas [116]) durchgeführt. Beiden Flüssigkeiten wurde für die Fluoreszenzburstanalyse der Farbstoff Rhodamin 6G (Radiant Dyes) in geringer Konzentration (10^{-12} mol/l) zugesetzt⁵. Die Reinheit der verwendeten Flüssigkeiten ist für die Experimente von entscheidender Bedeutung, weshalb großer Wert auf eine sorgfältige Handhabung der Proben gelegt wurde. Weiterhin wurden zusätzlich zu den Experimenten jeweils Referenzproben der Flüssigkeit ohne Farbstoff untersucht, um auszuschließen, dass Fluoreszenz von Verunreinigungen der Flüssigkeiten detektiert wird.

Die verwendeten Quartzsubstrate wurden vor der Benutzung sorgfältig gereinigt. Dazu wurden die Substrate zunächst in Alkohol (spektroskopischer Grad, Aldrich) und danach in Wasser (spektroskopischer Grad, Aldrich) gespült und im Anschluss mit einem Heißluftföhn getrocknet. Vor der Deposition der Flüs-

⁵Dazu stellt man zunächst mit wägbaren Mengen an Farbstoff und einem gut meßbaren Flüssigkeitsvolumen eine Urlösung mit definierter Konzentration her, die anschließend bis zur gewünschten Konzentration verdünnt wird.

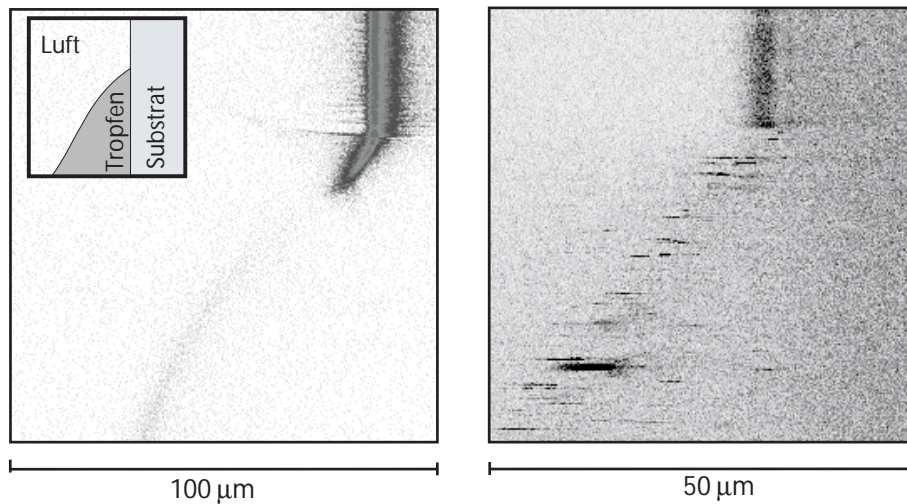


Abbildung 4.5: Beispiele für die Abbildung von Tropfenprofilen (Ethylenglykol/Rhodamin 6G auf Glas) mittels konfokaler Mikroskopie. Die Intensität ist in Graustufen kodiert (weiß: geringe Intensität, schwarz: hohe Intensität) Links: Abbildung im Reflektionskontrast. Rechts: Abbildung im Fluoreszenzkontrast, im Bild sind Spuren einzelner Moleküle als dunkle Streifen zu erkennen.

sigkeitströpfchen wurden die Substrate ebenfalls einer Kontrolluntersuchung im Konfokalmikroskop unterzogen, um eventuell vorhandene fluoreszierende Verunreinigungen zu erkennen. Alle Präparationen und die Experimente wurden bei Umgebungsbedingungen durchgeführt.

Da es Ziel der Experimente ist, die Diffusionseigenschaften der Farbstoffe am Rand des benetzenden Flüssigkeitstropfens mit denen im Tropfeninneren zu vergleichen, ist es zunächst nötig, das Tropfenprofil und die räumliche Lage des Tropfenrandes zu ermitteln. Dies erfolgte mittels bildgebender konfokaler Mikroskopie. Dabei ist es sowohl möglich, die Flüssigkeits/Luft-Grenzfläche im Reflektionskontrast zu erkennen, als auch, im Fluoreszenzkontrast Luft, Flüssigkeit und Substrat auf Grund der jeweils unterschiedlichen Untergrundlumineszenz zu unterscheiden (Abb. 4.5). Die hier beobachteten Ethylenglykoltropfen benetzen das Quarzglas partiell unter einem Kontaktwinkel von etwa 35 Grad. Damit kann unter Berücksichtigung der optischen Auflösung die Filmdicke der Flüssigkeit am Tropfenrand mit einer Genauigkeit von ca. 250 nm bestimmt werden. Wenn der Fokus mit größtmöglicher Genauigkeit an den Rand des Tropfens positioniert

wird, befindet sich in diesem Bereich ein etwa 0 bis 250 nm dicker Flüssigkeitskeil. Extrem dünne Flüssigkeitsfilme sind unter diesen experimentellen Bedingungen nicht nachzuweisen.

Nachdem der Tropfen unmittelbar nach der Deposition innerhalb weniger Minuten in seinen Gleichgewichtszustand (konstanter Kontaktwinkel) relaxiert ist, bleiben die beobachteten Tropfenprofile über jeweils mehr als zehn Minuten stabil. Diese Zeit ist ausreichend, um an einer bestimmten Stelle des Tropfens genügend Daten für die Fluoreszenzburstanalyse aufzuzeichnen, ohne dass sich in dieser Zeit das Tropfenprofil verändert. Über längere Zeiten verändert sich die Position des Tropfens durch Verdunstung der Flüssigkeit. Entsprechend erhöht sich damit auch die Farbstoffkonzentration, so dass Messungen nur in einem Zeitfenster von einigen Stunden nach Deposition des Tropfens durchgeführt werden können.

4.2.2 Präparation von Proben für die Einzelmolekülvideomikroskopie

Für die Untersuchungen der Diffusion in dünnen Flüssigkeitsfilmen mittels Einzelmolekülvideomikroskopie wurden zwei verschiedene Arten von Proben auf Quarzoberflächen präpariert: farbstoffdotierte benetzende Tropfen von TEHOS (Tetrakis(2-ethyl-hexoxy)-silan) und PDMS (Polydimethylsiloxan) sowie ausgedehnte ultradünne TEHOS-Filme. Bei TEHOS und PDMS (Abbildung 4.6) handelt es sich um Flüssigkeiten, deren Benetzungsverhalten bereits in einer großen Zahl von Experimenten charakterisiert wurde [16, 20, 41, 47, 52, 54, 58]. Zudem weisen beide Flüssigkeiten einen sehr niedrigen Dampfdruck auf. In einer Arbeit von Forcada et al. [13] wurde die Verdampfungsrates von dünnen TEHOS-Filmen bestimmt. Sie beträgt etwa $6 \cdot 10^{-3}$ nm/h (etwa 1 nm pro Woche) und nimmt mit abnehmender Filmdicke noch weiter ab [13]. Heslot konnte zeigen, dass das Volumen eines makroskopischen Tropfens bei Einbeziehung des Precursorlayers über längere Zeiträume (Wochen) erhalten bleibt [16]. Die hier beschriebenen Experimente wurden meist innerhalb weniger Stunden, längstens innerhalb von vier Tagen, nach Deposition der Tropfen durchgeführt, so dass Verdampfungseffekte vernachlässigt werden können. Das PDMS-Molekül ist kettenförmig, bei Raumtemperatur bildet PDMS eine Polymerschmelze. TEHOS ist dagegen ein nahezu kugelförmiges Molekül mit einem Durchmesser von ca. 1 nm. Sowohl von PDMS als auch von TEHOS ist bekannt, dass die Flüssigkeiten in der Nähe

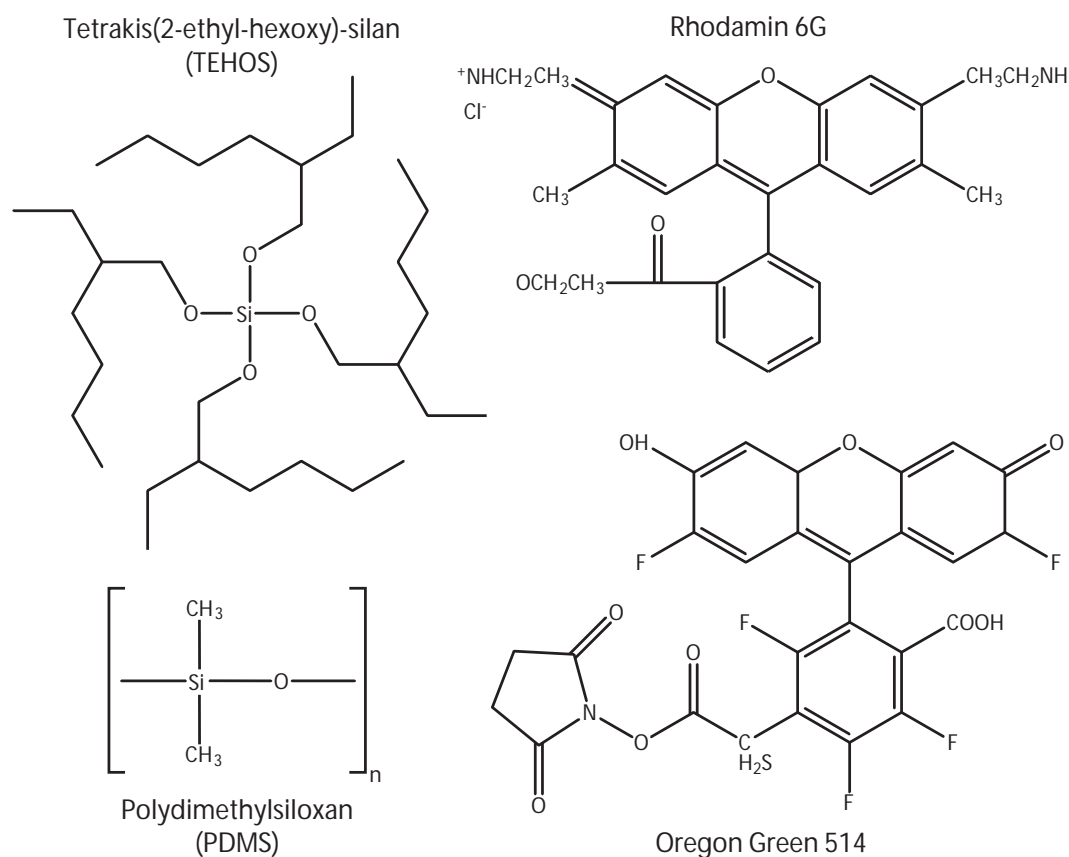


Abbildung 4.6: Strukturformeln der verwendeten Flüssigkeiten und Farbstoffe.

fester Grenzflächen das Phänomen des Liquid-Layering zeigen [11, 12, 68].

Als Sondenmoleküle wurden die Farbstoffe Rhodamin 6G (R6G) und Oregon Green 514 (OG514) ausgewählt (siehe Abbildung 4.6). Dabei handelt es sich um Farbstoffe mit sehr guten Fluoreszenzeigenschaften (hohe Quantenausbeute, hohe Photolebensdauer). Die beiden Farbstoffe unterscheiden sich vor allem dadurch, dass es sich bei R6G um einen ionischen Farbstoff handelt, während OG514 keine ionische Gruppe aufweist. Obwohl ursprünglich geplant, war es nicht möglich, farbstoffmarkierte Makromoleküle zu erhalten, die als ideale Sonden in einer Flüssigkeit aus gleichartigen Molekülen eingesetzt werden könnten. Deshalb soll an dieser Stelle betont werden, dass in den hier beschriebenen Experimenten immer Eigenschaften der Farbstoffe beobachtet werden. Inwieweit daraus auf die Eigenschaften der Flüssigkeit geschlossen werden kann, bedarf jeweils sorgfältiger Überlegung. Zur Auswahl der Farbstoffe wurden Experimente mit verschiedenen, auch unpolaren, Farbstoffen durchgeführt, wobei nur die genannten Farbstoffe ge-

eignete Löslichkeits- und Fluoreszenzeigenschaften aufweisen.

Die Quarz-Deckgläschen, die als Substrat für die flüssigen Proben dienen, wurden zunächst aufwändig gereinigt. Dazu wurden die Quarz-Substrate 5 min im Ultraschallbad in Piranha-Lösung, die aus gleichen Teilen Schwefelsäure (Aldrich) und Wasserstoffperoxid (30%, Fluka) besteht, bei einer Temperatur von 70 ° C von organischen Rückständen befreit und anschließend gründlich in Wasser (destilliert, entionisiert) gespült. Darauf folgt ein zweiter Reinigungsgang von 2 min im Ultraschallbad in konzentrierter NaOH-Lösung (Aldrich), ebenfalls bei 70 ° C. Schließlich werden die Substrate nochmals in Wasser gespült und anschließend mit Stickstoff abgeblasen, so dass sie frei von Wasserrückständen sind. Nach dieser Behandlung sind die Substratoberflächen hydrophob, was durch das Abperlen der Wasserrückstände überprüft werden kann. Vor der weiteren Behandlung der Substrate wurde im Weitfeldmikroskop überprüft, ob auf der Oberfläche fluoreszierende Verunreinigungen zu erkennen sind. Substrate mit einer hohen Anzahl fluoreszierender Verunreinigungen wurden ausgesondert. Es ist jedoch nicht möglich, die Oberflächen mit nasschemischen Methoden so zu reinigen, dass keinerlei fluoreszierende Verunreinigungen zurückbleiben. Jedoch kann sichergestellt werden, dass die verbleibenden Verunreinigungen eine weitaus geringere Flächenkonzentration aufweisen, als die später aufgetragenen Farbstoffmoleküle.

Die Oberflächenrauigkeit der verwendeten Quarzsubstrate wurde mittels Rasterkraftmikroskopie überprüft [117]. Dabei wurden in allen Fällen RMS-Rauigkeiten unterhalb von 1 nm gemessen. Die typischen Längenskalen, auf denen sich das Höhenprofil der Oberfläche um bis zu 1 nm ändert, liegen bei einigen hundert Nanometern, so dass sich auf molekularer Skala das Bild einer sehr glatten Oberfläche bietet.

Benetzende Tropfen

Zur Präparation von TEHOS-Tröpfchen (Proben DT-X, X kodiert den verwendeten Farbstoff) wurden die polaren Farbstoffe Rhodamin 6G (Radiant Dyes) bzw. Oregon Green 514 (Molecular Probes O-6139) in Tetrakis(2-ethyl-hexoxy)-silan (Alfa, $\eta = 6.8 \cdot 10^{-3}$ Pa s) gelöst. Die verwendeten Farbstoffe sind in TEHOS sehr schlecht, d.h. nur in geringer Konzentration löslich. Deshalb wurde die Lösung für eine Stunde im Ultraschallbad behandelt und anschließend einen Tag stehen lassen, so dass sich ungelöste Farbstoffpartikel am Boden absetzen können. Da-

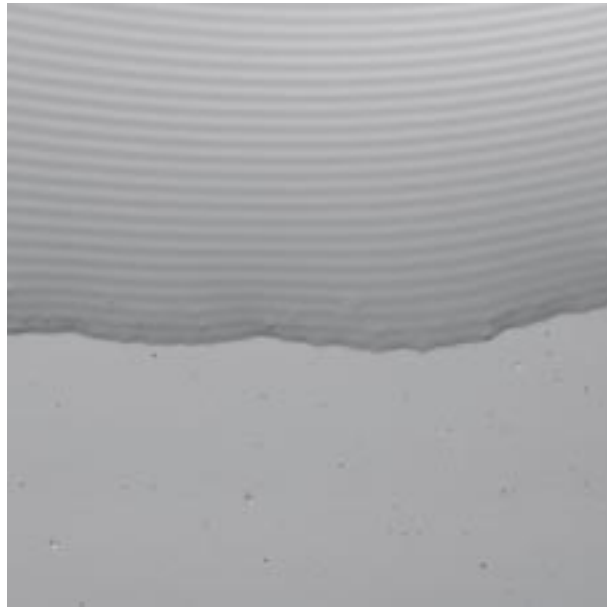


Abbildung 4.7: *Konfokalmikroskopische Aufnahme vom Rand eines TEHOS-Tropfens im Reflexionskontrast (Bildbereich: $0.23 \times 0.23 \text{ mm}^2$).*

nach wurde mit einer Pipette der obere Teil der Lösung entnommen und nur dieser Teil weiter verwendet. Die TEHOS/Farbstoff-Lösungen haben eine nominelle Konzentration von ca. 10^{-7} mol/l (unter der Annahme, dass der Farbstoff vollständig gelöst ist), die tatsächliche Konzentration liegt deutlich darunter, so dass die so präparierten Lösungen eine Detektion einzelner Farbstoffmoleküle erlauben. Kleine Tröpfchen dieser Lösung (Durchmesser ca. 1 mm) wurden mit einer Kanüle auf den bereits im Weitfeldmikroskop montierten Quarzsubstrate deponiert, so dass die Proben unmittelbar nach der Deposition der Tropfen untersucht werden können. In analoger Weise wurden für Vergleichsexperimente Proben mit Tröpfchen von PDMS (Aldrich, $\eta = 5 \cdot 10^{-2} \text{ Pa s}$), dotiert mit Rhodamin 6G präpariert (Proben DP-R).

Das Weitfeldmikroskop bietet keine Möglichkeiten, die Position und das Profil der Tropfen in situ exakt zu vermessen. Im total reflektierten Anregungslicht ist jedoch der makroskopische Tropfenrand deutlich zu erkennen, so dass zuverlässig zu unterscheiden ist, ob sich der Anregungsspot innerhalb oder außerhalb des makroskopischen Tropfens befindet.

Unabhängig von den Experimenten im Weitfeldmikroskop wurden in gleicher Weise präparierte Proben an einem Zeiss-Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 510)

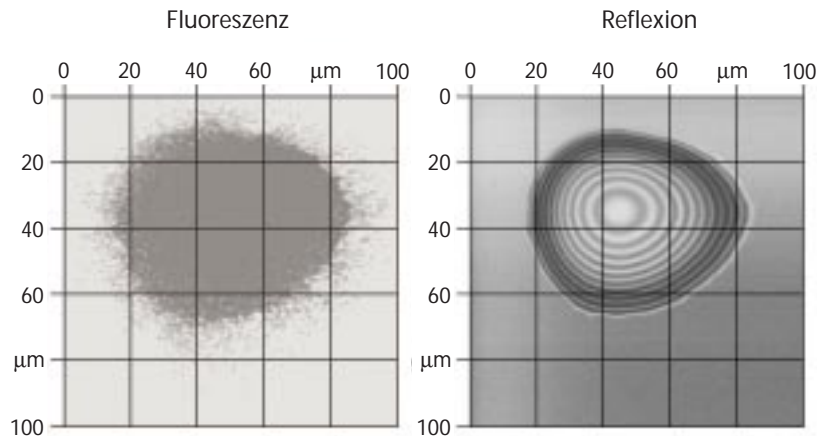


Abbildung 4.8: Konfokalmikroskopische Aufnahme eines mit Rhodamin 6G dotierten PDMS-Tropfens (links: Fluoreszenz, rechts: Reflexion, $\lambda = 514 \text{ nm}$).

untersucht. Abbildung 4.7 zeigt ein Bild vom Rand eines TEHOS-Tropfens, das mit diesem Mikroskop im Reflexionskontrast aufgenommen wurde. Die deutlich sichtbaren Interferenzringe markieren das Höhenprofil des Tropfens. Es ist ebenfalls zu erkennen, dass der Tropfenrand eine unregelmäßige Struktur aufweist, was vermutlich auf eine Verankerung (Pinning) der Kontaktlinie an Verunreinigungen auf der Quarzoberfläche zurückzuführen ist.

Der Precursorlayer kann mit den vorhandenen lichtmikroskopischen Techniken nicht direkt abgebildet werden. Entsprechend den im Abschnitt 2.1.1 vorgestellten Experimenten [16, 20, 41, 47, 52, 54, 58] ist aber davon auszugehen, dass sich in unmittelbarer Nähe des Tropfenrandes innerhalb weniger Minuten ein monomolekular dünner (ca. 1nm) Precursorfilm ausbildet.

Dieser Precursorfilm kann auch indirekt nachgewiesen werden, indem die Ausbreitung eines farbstoffdotierten Tropfens im Konfokalmikroskop verfolgt wird. Während im Reflexionskontrast das Profil des makroskopischen Tropfens als Interferenzmuster sichtbar ist, kann simultan im Fluoreszenzkanal die Ausbreitung des Farbstoffs auf dem Substrat verfolgt werden. In Abbildung 4.8 ist eine solche konfokale Aufnahme eines mit Rhodamin 6G in hoher Konzentration dotierten PDMS-Tropfens dargestellt, die eine Stunde nach Deposition des Tropfens aufgenommen wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass auch außerhalb des im Interferenzbildes zu erkennenden Tropfenrandes bereits Fluoreszenz detektiert werden kann, die nur von Farbstoffmolekülen stammen kann, die sich im Precursorlayer befinden.

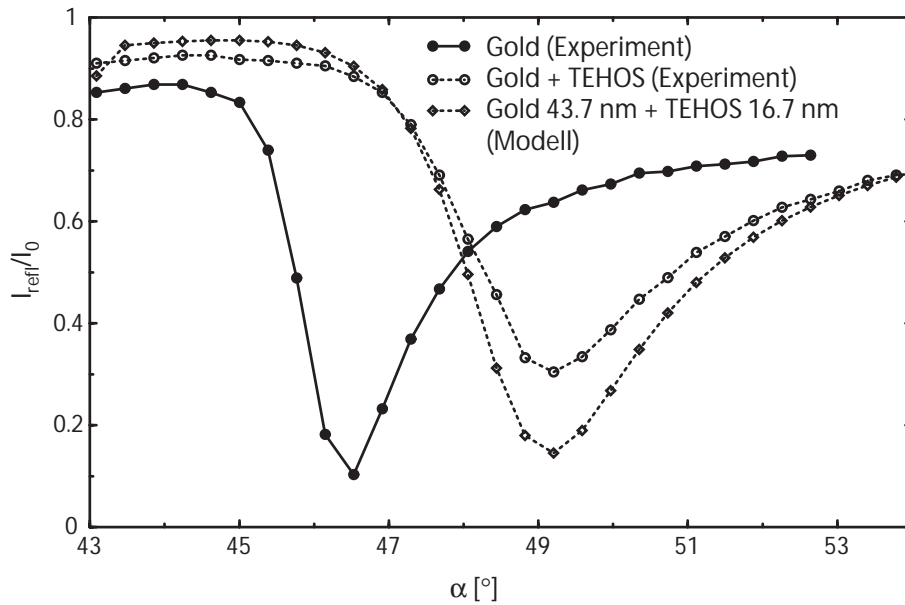


Abbildung 4.9: *Bestimmung der Filmdicke für die Probe FQ-17 mittels SPR (durchgezogene Linie: reine Goldoberfläche, gestrichelte Linie: TEHOS - bedeckte Goldoberfläche, Messung und Modellrechnung).*

Ultradünne Flüssigkeitsfilme

Ausgedehnte ultradünne Flüssigkeitsfilme (Proben FQ-X, X kodiert die Filmdicke) wurden mit einer Methode hergestellt, die in einer Arbeit zu Röntgenbeugungsuntersuchungen des Liquid Layering von TEHOS [11, 118] ausführlich beschrieben wird. Dazu wurde die TEHOS/Farbstoff-Lösung (40 bzw. 10 μl) in 10 ml Hexan gelöst. Anschließend werden die gereinigten Quarzsubstrate 30 s in die Hexan-Lösung getaucht und langsam (ca. 1 mm/s) herausgezogen. Nach einer Ruhezeit von einer Stunde ist das Hexan auf der Probe vollständig verdampft und es bleibt ein dünner TEHOS/Farbstoff-Film auf der Probe zurück [118]. Die Dicke des Films ist dabei proportional zur Konzentration der TEHOS (+ Farbstoff) - Hexan - Lösung und indirekt proportional zur Wurzel aus der Geschwindigkeit, mit der die Substrate aus der Lösung gezogen werden [118].

In analoger Weise wurden TEHOS-Filme auf einem Silizium-Substrat, das mit einer 100 nm dicken SiO_2 -Schicht bedeckt ist [119], präpariert (Probe FSi-X). Dazu wurde die SiO_2 -Oberfläche in gleicher Weise wie die Quarz-Substrate gereinigt.

Um die Dicke der Filme zu bestimmen, wurde unter identischen Bedingun-

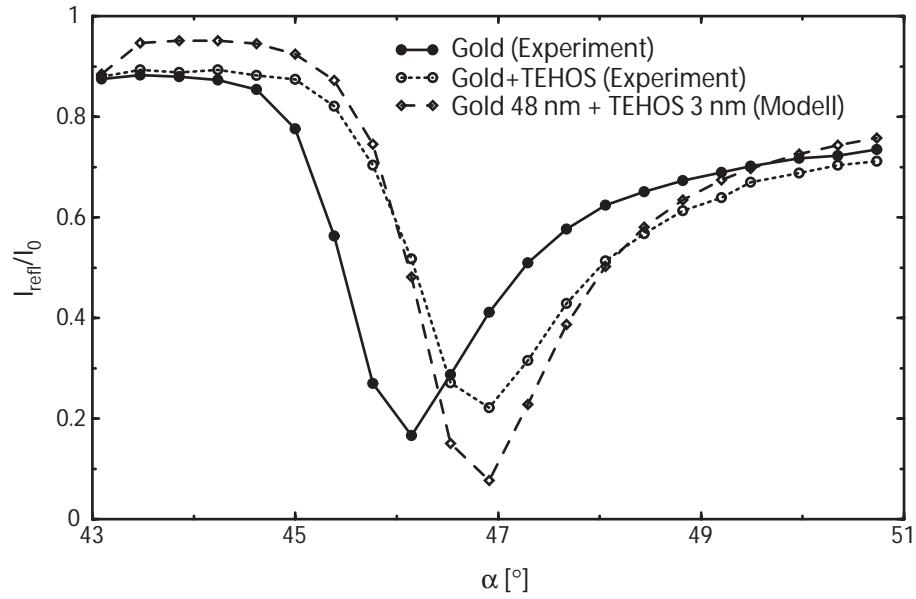


Abbildung 4.10: *Bestimmung der Filmdicke für die Probe FQ-3 mittels SPR (durchgezogene Linie: reine Goldoberfläche, gestrichelte Linie: TEHOS - bedeckte Goldoberfläche, Messung und Modellrechnung).*

gen zu jedem Quarzsubstrat ein mit einem dünnen Goldfilm (40 – 50 nm) bedampftes Glassubstrat [119] beschichtet. Da Hexan beide Typen von Substraten vollständig benetzt, ist davon auszugehen, dass auch die Filmbildung in beiden Fällen vergleichbar ist. Mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) [120] kann auf den mit Gold beschichteten Substraten die Dicke des TEHOS-Films vermessen werden [121]. Die SPR-Messungen wurden in einer Kretschmann-Raether-Konfiguration mit einem Helium-Neon-Laser ($\lambda = 632.8$ nm) an einem Quarzprisma, das drehbar auf einem Rotationstisch montiert wurde, durchgeführt.

Für Probe FQ-17 ergibt sich eine Filmdicke von (17 ± 2) nm (Abbildung 4.9). Für den wesentlich dünneren Film auf Probe FQ-3 ergibt sich eine Filmdicke (3 ± 1) nm (Abbildung 4.10). Die Modellrechnungen zur Schichtdickenbestimmung wurden mit dem Programm Nphase erstellt (Parameter: $n_{Prisma} = 1.46$, $n_{Gold} = 0.13 + 3.16i$, $n_{TEHOS} = 1.41$). Das ermittelte Verhältnis der Schichtdicken entspricht in guter Näherung dem Konzentrationsverhältnis von TEHOS in den beiden Hexan-Lösungen ($4 \cdot 10^{-3}$ für den dickeren bzw. $1 \cdot 10^{-3}$ für den dünneren Film), mit denen die Proben hergestellt wurden.

An den auf Goldsubstraten präparierten Filmen können keine Experimente zur Einzelmoleküldetektion durchgeführt werden, da durch die Anwesenheit des

Metallfilms die Fluoreszenz der Farbstoffe gelöscht wird.

Übersicht

Abschließend vermittelt Tabelle 4.1 einen Überblick über die für die Einzelmolekülvideomikroskopie präparierten Proben.

Name	Substrat	Flüssigkeit	Farbstoff	Präparation
DT-R	Quarz	TEHOS	Rhodamin 6G	Tropfen
DT-O	Quarz	TEHOS	Oregon Green 514	Tropfen
DP-R	Quarz	PDMS	Rhodamin 6G	Tropfen
FQ-17	Quarz	TEHOS	Rhodamin 6G	dicker Film (17 nm)
FQ-3	Quarz	TEHOS	Rhodamin 6G	dünner Film (3 nm)
FSi-17	Si+SiO ₂	TEHOS	Rhodamin 6G	dicker Film (17 nm)

Tabelle 4.1: *Übersicht der Proben*

4.3 Datenanalyse

4.3.1 Fluoreszenzburstanalyse

Um aus den Zeitreihen der Fluoreszenzintensität $I(t)$ von durch den Fokus des konfokalen Mikroskops diffundierenden Molekülen Diffusionskonstanten zu berechnen, wird ein statistischer Zugang gewählt, der zunächst der in [31] vorgeschlagenen Methode folgt. Dabei wird die Häufigkeitsverteilung $N(\tau_B)$ der Zeiten τ_B analysiert, die einzelne Moleküle benötigen, um durch das Fokalvolumen des konfokalen Mikroskops zu diffundieren.

Die Zeit, die ein einzelnes Farbstoffmolekül braucht, um durch das Fokalvolumen zu diffundieren, entspricht der Länge des in der Zeitreihe der Fluoreszenz beobachteten Fluoreszenzbursts τ_B . Um einzelne Fluoreszenzbursts zu unterscheiden, muss eine geeignete Schwelle I_t gesetzt werden, die Bursts, die von der Diffusion einzelner Moleküle herrühren, von dem ebenfalls fluktuierenden Untergrundsignal I_B der Fluoreszenz unterscheidet. Dazu wurde die Schwelle auf

$I_t = 2 \langle I(t) \rangle$ gesetzt, wobei $\langle I(t) \rangle$ näherungsweise dem Wert von I_B entspricht, da in 93% der Messzeit keine Bursts detektiert werden. Diese Schwelle ist so gewählt, dass kleine Änderungen der Wahl des Wertes von I_t die ermittelte Häufigkeitsverteilung der Burstlänge praktisch nicht beeinflussen⁶. In Abbildung 4.11 ist die Wahl der Detektionsschwelle I_t anhand experimenteller Daten illustriert.

Berücksichtigt man das Photobleichen der Farbstoffe, kann die Zeit, die ein Molekül im Fokalvolumen verbleibt, deutlich länger sein, als die Zeit während der ein Fluoreszenzburst beobachtet wird. Durch Kontrollmessungen, die keine Abhängigkeit der gemessenen Verteilungen $N(\tau_B)$ von der verwendeten Laserleistung erkennen ließen, kann der Einfluss von Photobleichen aber ausgeschlossen werden. Bei der hier verwendeten Laserleistung ist also die Zahl der durch ein einzelnes Molekül in einem Burst emittierten Photonen $\langle N_{phot,burst} \rangle$ deutlich kleiner als die Zahl der im Mittel vor dem Photobleichen emittierten Photonen $\langle N_{phot,bleach} \rangle$. Aus der Zeitreihe $I(t)$ kann also jetzt durch die Identifikation einzelner Bursts die Häufigkeitsverteilung $N(\tau_B)$ berechnet werden und τ_B kann als Diffusionszeit eines einzelnen Moleküls durch das Fokalvolumen identifiziert werden.

In der konfokalen Mikroskopie werden im Wesentlichen Diffusionskomponenten senkrecht zur optischen Achse analysiert [30], da die axiale Ausdehnung des konfokalen Spots deutlich größer (etwa um einen Faktor 5) als die laterale Ausdehnung ist. Der konfokale Spot kann also in guter Näherung als ausgedehnter Zylinder modelliert werden [30, 31] und die Diffusion von Molekülen durch den Spot ist dann näherungsweise ein zweidimensionaler Diffusionsprozess. Damit ist die Diffusion eines Moleküls durch den Fokus vergleichbar mit dem “First Passage Problem”, das aus der Stochastik bekannt ist und die Diffusion eines Partikels vom Zentrum zum Rand eines kreisförmigen Gebiets beschreibt. Die exakte Lösung [31, 122] des First Passage Problems für die Wahrscheinlichkeitsdichte $p(\tau_B)$ lautet:

$$p(\tau_B) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha_n D}{\omega_0^2 J_1(\alpha_n)} \exp\left(-\frac{\alpha_n^2 D}{\omega_0^2} \tau_B\right) \quad (4.3)$$

Dabei beschreibt $p(\tau_B)$ die Wahrscheinlichkeitsdichte der Burstlänge τ_B für die Diffusion vom Zentrum zum Rand des Fokalvolumens. $J_1(\alpha_n)$ ist eine Besselfunktion 1. Ordnung und α_n sind die Lösungen von $J_1(\alpha_n) = 0$. Mit ω_0 wird der Radius des Fokalvolumens bezeichnet ($I(\omega_0) = 1/e^2$). D ist die Diffusionskon-

⁶Konkret heisst das, dass der durch die Wahl der Schwelle verursachte Meßfehler deutlich kleiner, als andere, im Experiment relevante, Meßfehler ist.

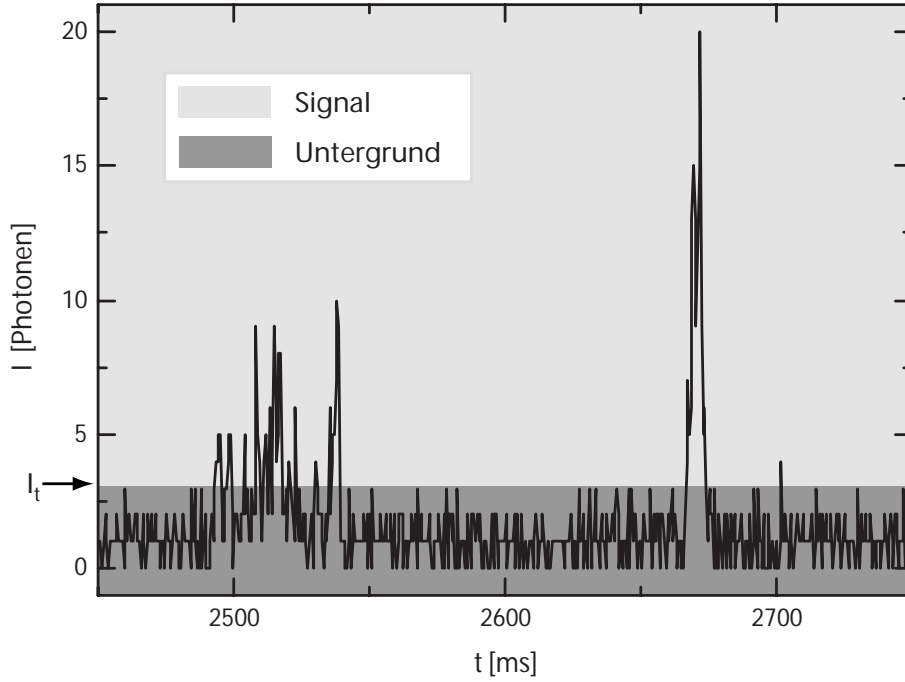


Abbildung 4.11: Zur Wahl der Intensitätsschwelle für die Fluoreszenzburstanalyse.

stante des Moleküls. Für große Werte von τ_B vereinfacht sich Glg. 4.3 zu einer Poisson-Verteilung, da für $n > 1$ gilt: $\alpha_n^2 \gg \alpha_1^2$. Ersetzt man $p(\tau_B)$ durch die Bursthäufigkeit $N(\tau_B)$ ergibt sich

$$N(\tau_B) = N(0) \exp(-\tau_B/\tau_D) \quad (4.4)$$

mit der charakteristischen Diffusionszeit⁷

$$\tau_D = \omega_0^2/(\alpha_1^2 D) \quad (4.5)$$

und $\alpha_1 = 2.4$. Damit erhält man die Diffusionskonstante durch Auftragen von $\ln(N(\tau_B))$ über τ_B und eine lineare Regression für den Anstieg der Kurve bei großen Werten von τ_B . Im Gegensatz zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ist also für die Datenauswertung der Fluoreszenzburstanalyse nur eine lineare

⁷Eine andere typische Diffusionszeit τ_{Diff} erhält man durch eine einfache Überlegung: Ersetzt man in Gleichung 2.17 die mittlere quadratische Verschiebung $\langle x \rangle^2$ durch ω_0^2 und die Zeit t durch τ_{Diff} erhält man $\tau_{Diff} = \omega_0^2/(4D)$. Diese typische Diffusionszeit hat zwar die richtige Größenordnung, beschreibt aber das Experiment nicht exakt.

Regression der Daten mit einem einzigen Parameter nötig. Der Wert von ω_0 kann unabhängig aus anderen Experimenten (bildgebende Konfokalmikroskopie) bestimmt werden.

Obwohl das oben beschriebene First Passage Problem der im Experimente vorgefundenen Situation ähnelt, beschreibt es diese doch nicht exakt. Während im Experiment ein Fluoreszenzburst beginnt, wenn ein Farbstoffmolekül in das Fokalvolumen eintritt, beschreibt das First Passage Problem den Diffusionsprozess eines Moleküls, das im Zentrum des Fokalvolumens startet. In der Arbeit von Ko et al. [31] wird die in den Gleichungen 4.3 und 4.4 beschriebene Lösung des First Passage Problems benutzt, um mit einem konfokalen Mikroskop gewonnene Diffusionsdaten in der oben beschriebenen Weise auszuwerten. Im Folgenden soll diskutiert werden, ob dieses Vorgehen gerechtfertigt ist. Die experimentelle Situation (Diffusion von Rand zu Rand des Fokalvolumens) soll als Edge to Edge Diffusion (EED), das First Passage Problem als Center to Edge Diffusion (CED) bezeichnet werden.

Im Falle von EED ist zu erwarten, dass die Verteilung $N(\tau_B)$ von vielen kurzen Bursts dominiert wird, die von Molekülen herrühren, die am Rand des Fokalvolumens diffundieren und dabei häufig für kurze Zeiten in das Fokalvolumen eindringen [123], während im Falle von CED kurze Bursts sehr selten sind, da die Moleküle stets einen endlichen Weg bis zum Rand des Fokalvolumens zurücklegen müssen. Da das durch das Experiment gegebene EED-Problem nicht analytisch lösbar ist, wurden Computersimulationen des Diffusionsprozesses durchgeführt, um die Ergebnisse beider Modelle zu vergleichen. Der Diffusionsprozess eines einzelnen Moleküls wurde dabei als dreidimensionaler Random Walk in einer Box mit periodischen Randbedingungen auf dem Computer modelliert. Die Intensitätsverteilung des Fokus wird durch die konfokale Point Spread Function (PSF) [101]

$$I(r, z) = \frac{J_1^4(r) \sin^4(z/4)}{16r^4z^4} \quad (4.6)$$

beschrieben, die auf $I(0, 0) = 1$ normiert ist. $J_1(r)$ ist wiederum die Besselfunktion 1. Ordnung, r und z sind Koordinaten senkrecht und parallel zur optischen Achse⁸. Das Fokalvolumen wird definiert als $I(r, z) > 1/e^2$, für alle kleineren Wer-

⁸Die 4. Potenzen in Glg. 4.6 rühren daher, dass anders als im Abschnitt 2.3.1 der optische Abbildungsprozess zweimal, jeweils für Anregung und Detektion, durchlaufen wird. Für ein idealisiertes Abbildungssystem kann das Produkt der PSF für Anregung und Detektion anstelle der sonst nötigen Faltung verwendet werden.

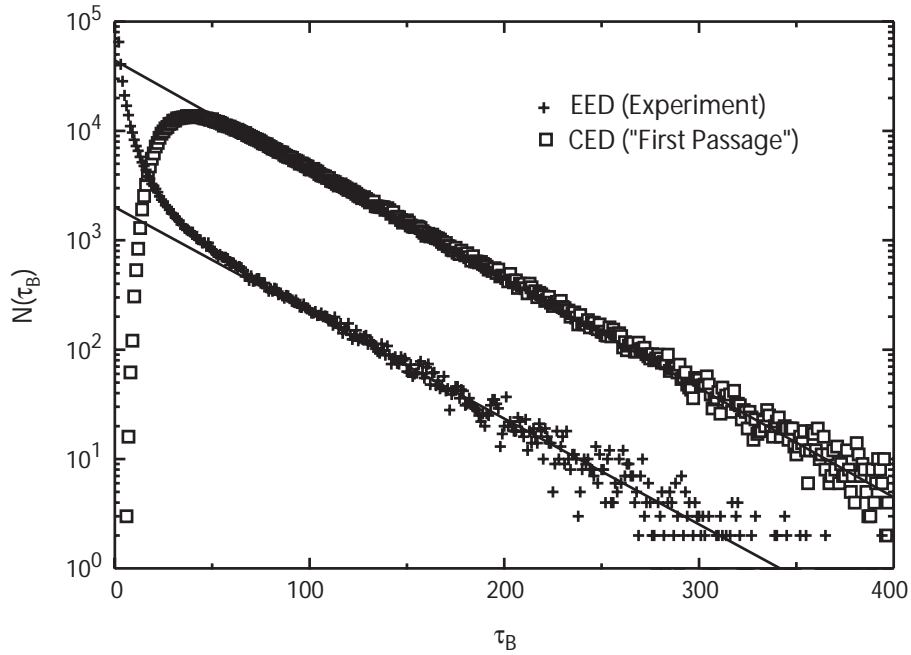


Abbildung 4.12: Vergleich der Burstlängenstatistiken aus Computersimulationen für EED (Kreuze) und CED (Quadrate). Die durchgezogenen Linien sind jeweils die Ergebnisse linearer Regression für $\tau_B > 100$.

te von I wird $I = 0$ gesetzt. Der Random Walk wird für die Modellierung des EED-Problems an einem zufällig gewählten Punkt außerhalb des Fokalvolumens gestartet. Während des Random Walk wird für jeden Zeitschritt die Intensität am Ort des Random Walker aufgezeichnet, wobei davon ausgegangen wird, dass das Fluoreszenzsignal proportional zur Intensität ist. Die so entstehenden Zeitreihen werden in der oben beschriebenen Weise analysiert, wobei der Schwellwert für die Bestimmung der Burstlänge auf Null gesetzt wird. In analoger Weise wird das CED-Problem modelliert, indem der Random Walk jeweils im Zentrum des Fokalvolumens ($r = 0, z = 0$) gestartet wird.

In Abbildung 4.12 werden die Ergebnisse für beide Modelle verglichen. Wie erwartet, ist in dem durch das Experiment gegebenen EED-Problem die Verteilung $N(\tau_B)$ von sehr kurzen Bursts dominiert, während die aus der Modellierung des CED-Problems resultierende Verteilung für sehr kurze Burstzeiten gegen Null geht. Das Verhalten beider Verteilungen für große Burstzeiten ist jedoch identisch, in der logarithmischen Darstellung weisen hier beide Verteilungen den gleichen Anstieg auf. Damit ist es also gerechtfertigt, die analytisch exakten

Ergebnisse des First Passage Problems für das Langzeitverhalten von $N(\tau_B)$ auch in der durch das Experiment gegebenen Situation zu verwenden.

Die positiven Abweichungen der Burstlängenstatistik von einem monoexponentiellen Verhalten für kurze Burstlängen sind ein charakteristisches Merkmal des Diffusionsprozesses einzelner Moleküle durch das Fokolvolumen. Derartige Abweichungen wurden in einer Reihe von Experimenten beobachtet [123–126]. Einige Autoren [124–126] interpretieren diese zusätzlichen kurzen Fluoreszenzbursts als das Ergebnis eines optischen Einfangprozesses (Optical Trapping), in Analogie zur Funktionsweise optischer Pinzetten (Optical Tweezer [127]). Tatsächlich wird in diesen Arbeiten auch eine Zunahme der Anzahl der kurzen Bursts mit zunehmender Anregungsintensität beobachtet. Die oben erwähnten Computersimulationen legen jedoch nahe, dass auch ohne optische Einfangprozesse deutlich mehr kurze Bursts detektiert werden, als Gleichung 4.4 erwarten lässt. Die in Experimenten beobachtete Leistungsabhängigkeit der Burstlängenstatistik kann auch durch eine Zunahme der Detektionswahrscheinlichkeit für kurze Bursts durch die Verbesserung des Signal/Untergrund-Verhältnisses mit zunehmender Anregungsleistung erklärt werden.

4.3.2 Bildbearbeitung

Als Ergebnis der Videomikroskopie erhält man Serien von aufeinanderfolgenden Bildern, die an unterschiedlichen Positionen Abbilder einzelner Moleküle, aber auch Rauschen und andere Bildfehler enthalten.

Um diese Bildserien einer quantitativen Analyse zuzuführen, ist es zunächst erforderlich, in diesen Bildserien einzelne Moleküle zu identifizieren, deren charakteristische Parameter zu bestimmen (Position, Intensität, Spotgröße, SNR) und schließlich diffundierende Moleküle über mehrere Bilder zu verfolgen (Tracking) um so die Trajektorien der Diffusion zu bestimmen. Da in den Messungen eine sehr große Menge an Daten anfällt, ist es unmöglich, diese Daten für eine hohe Zahl von Messungen von Hand zu analysieren. Deshalb wurde für die Auswertung der Daten ein Computerprogramm erstellt, das die automatische Analyse der Daten auf einer UNIX-Workstation ermöglicht.

Die Aufgabe, in aufeinanderfolgenden Bildern helle Objekte zu erkennen und über mehrere Bilder zu verfolgen, kann ein menschlicher Betrachter leicht lösen. Die Automatisierung dieser Funktion durch Computersoftware ist dagegen

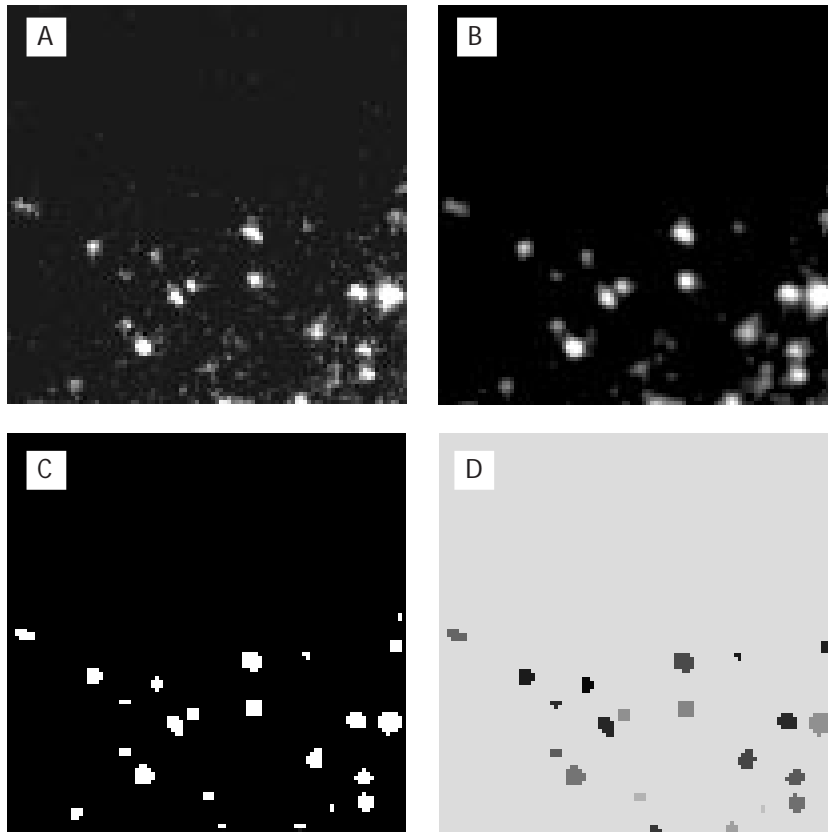


Abbildung 4.13: *Schritte der Bildverarbeitung: Rohdaten (A), geglättetes Bild (B), segmentiertes Bild (C) und Gruppierung und Nummerierung (D). In den Bildern A und B ist die Intensität in Graustufen kodiert (schwarz: niedrige Intensität, weiß: hohe Intensität). Im Bild D kodieren unterschiedliche Graustufen unterschiedliche, vom Programm erkannte, Objekte.*

schwierig und Gegenstand intensiver Forschungstätigkeit auf dem Gebiet der automatischen Bildbearbeitung [128]. Die Gegenwart von Rauschen und Schwankungen der Helligkeit der zu verfolgenden Objekte erschweren die Aufgabe zusätzlich. Zur Lokalisierung und Verfolgung der diffundierenden Moleküle wird hier ein relativ einfacher Algorithmus eingesetzt. Der Algorithmus wurde soweit optimiert, dass Objekte, die nicht eindeutig identifiziert werden können, verworfen werden. Das gilt insbesondere, wenn sich während der Diffusion zwei Moleküle so weit nähern, dass nicht mehr eindeutig zu unterscheiden ist, ob es sich um einen oder mehrere Spots handelt. Damit werden zwar von der Software einige detektierte Objekte verworfen, es kann aber sichergestellt werden, dass die übrigen Objekte mit hoher Sicherheit identifiziert, lokalisiert und verfolgt werden

können.

In einem ersten Schritt der Bildverarbeitung werden die Bilder geglättet. Dazu wird ein Binomial-Filter [128] verwendet, der gegenüber anderen Glättungsfiltern den Vorteil hat, dass er die Form von Objekten nur wenig beeinflusst. Die Glättung der Bilder ist nötig, um das Rauschen zu dämpfen und damit die nachfolgende Segmentierung der Bilder zu erleichtern.

Aufgabe der Segmentierung ist es, Objekte, die für die weitergehende Analyse von Interesse sind (also hier einzelne Moleküle im Bild), vom Untergrund zu trennen. Für die Segmentierung ist es nötig, einen Schwellwert festzulegen, der Signale vom Rauschen trennt. Dazu wird zunächst der Mittelwert der Intensität I_{bg} und seine Streuung σ_{bg} über alle Pixel berechnet. Anschließend werden in einem zweiten Schritt I_{bg} und σ_{bg} erneut berechnet, wobei in diesem Schritt alle Pixel mit $I_i > I_{bg} + 4\sigma_{bg}$ von der Mittelung ausgeschlossen werden. Damit erhält man einen sehr zuverlässigen Näherungswert für die Untergrundintensität und die Amplitude des Rauschens der Untergrundintensität. Anschließend wird von jedem Bild eine Binärmaske erstellt, in der alle Pixel mit $I_i > I_{bg} + 4\sigma_{bg}$ (helle Pixel) auf den Wert 1 und alle anderen Pixel auf den Wert 0 gesetzt werden.

In dieser Binärmaske werden im Folgenden zusammenhängende Gruppen von hellen Pixeln gesucht und nummeriert. Damit erhält man für jedes Bild eine Liste aller Gruppen von hellen Pixeln. Pixelgruppen, die eine Größe von 9 Pixeln unterschreiten, werden aus der Liste eliminiert. In Abbildung 4.13 sind die Ergebnisse der bisherigen Bildbearbeitungsschritte für eine relativ komplizierte experimentelle Situation (viele Moleküle am Rand eines Tropfens, hoher Rauschanteil) dargestellt.

Zur weiteren Analyse der Pixelgruppen werden wieder die geglätteten Originaldaten hinzugezogen. An dieser Stelle werden Pixelgruppen eliminiert, die für die weiteren Analyseschritte nicht geeignet sind (zu geringe mittlere Intensität u. Ä.). Die verbleibenden Objekte werden an eine zweidimensionale Gaußfunktion

$$I(\underline{r}) = I_{bg} + I_0 \exp \left\{ -\frac{1}{2} \left[\frac{[(\underline{r} - \underline{r}_0) \times \underline{e}]^2}{\sigma_s^2} + \frac{[(\underline{r} - \underline{r}_0) \cdot \underline{e}]^2}{\sigma_l^2} \right] \right\} \quad (4.7)$$

angepasst, um Position, Größe und Höhe der Spots mit größtmöglicher Genauigkeit zu bestimmen, wobei gegenüber der Fitfunktion in Abschnitt 3.4 die Untergrundintensität I_{bg} als zusätzlicher Parameter eingeführt wurde. Nach dieser

Prozedur steht nun als Ergebnis der Anpassung an eine zweidimensionale Gaußfunktion für jedes Bild der Bildserie eine Liste aller identifizierten Objekte mit folgenden Parametern zur Verfügung: Koordinaten x_0 und y_0 des Zentrums, maximale Intensität I_0 sowie die Spotbreiten σ_s und σ_l (breite und schmale Achse der zweidimensionalen Gaußverteilung).

Im Folgenden müssen nun die in den einzelnen Bildern identifizierten und charakterisierten Objekte in aufeinanderfolgenden Bildern wiedererkannt und zu Trajektorien zusammengesetzt werden (Tracking). Dieses Problem wird dadurch erschwert, dass einzelne Moleküle Intensitätsfluktuationen (Single Molecule Blinking) zeigen und somit nicht immer in aufeinanderfolgenden Bildern sichtbar sind. Befinden sich mehrere Moleküle im Bildbereich, so ist es auch möglich, dass sich deren Trajektorien überkreuzen. In dieser Situation ist es nicht möglich, eindeutig zu entscheiden, zu welchem der beiden Moleküle die von einem solchen Kreuzungspunkt weiterführenden Trajektorien gehören. Für die weitere Analyse der Trajektorien ist dies allerdings ohne Bedeutung, da einzelne, identische Moleküle ohnehin nicht unterscheidbar sind.

Um Trajektorien zu konstruieren, werden jeweils ausgehend von einem bestimmten Objekt in einem Bild zur Zeit t_i benachbarte Objekte in nachfolgenden Bildern zur Zeit t_{i+j} (mit $j \leq 3$) gesucht. Dazu wird der Abstand zu allen anderen Objekten berechnet, wobei auch die Ausdehnung des Spots in die Berechnung des Abstands eingeht⁹. Als Nachfolger des Anfangsobjekts in der Trajektorie wird das Objekt ausgewählt, dessen Abstand am kleinsten ist und das einen gegebenen Maximalabstand¹⁰ nicht überschreitet. Das als Nachfolger ausgewählte Objekt wird markiert und steht damit für die weitere Suche nicht zur Verfügung. Dieser Prozess wird wiederholt, bis alle detektierten Objekte einer Trajektorie (die dann auch aus nur einem Objekt bestehen kann) zugeordnet sind. Eine Trajektorie endet, wenn sich kein Nachfolgeobjekt finden lässt oder das letzte Bild der Bildserie erreicht ist. Dieser Algorithmus ermöglicht in den meisten Fällen eine korrekte Zuordnung der Moleküle zu Trajektorien auch dann, wenn Mole-

⁹Für zwei Objekte, deren Schwerpunkte bei \underline{r}_1 und \underline{r}_2 liegen und die eine Ausdehnung d_1 und d_2 aufweisen wird der Abstand als $\Delta = |\underline{r}_1 - \underline{r}_2| - d_1 - d_2$ berechnet. Der so definierte Abstand kann auch negative Werte annehmen, was bedeutet, dass sich die Spots in aufeinanderfolgenden Bildern überschneiden.

¹⁰Der Maximalabstand $\Delta_{min}(j) = \sqrt{4j}$ wurde so gewählt, dass er mit zunehmendem j ebenfalls zunimmt, um zu berücksichtigen, dass sich ein diffundierendes Objekt mit zunehmender Zeit weiter von seinem Ausgangspunkt entfernt.

küle Dunkelperioden einer Länge, die der doppelten Belichtungszeit entspricht, aufweisen.

Von den so bestimmten Trajektorien werden nun diejenigen ausgewählt, die aus mehr als 20 Einzelbeobachtungen bestehen. Diese werden, sortiert nach Trajektorien mobiler und immobiler Moleküle¹¹, für die weitere Auswertung mit den charakteristischen Parametern der detektierten Moleküle gespeichert.

4.3.3 Trajektorienanalyse und Analyse der Spotgrößen

Aus den durch die automatische Bildverarbeitung generierten Trajektorien können nun Diffusionskonstanten der diffundierenden Moleküle berechnet werden. Dies geschieht zum einen durch die Berechnung der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD), zum anderen durch die Analyse der Spotgröße. Dabei ist zu beachten, dass mit dem hier beschriebenen Weitfeldaufbau nur laterale Komponenten der Diffusion zugänglich sind. Die erreichbare axiale Auflösung liegt weit über der Dicke der untersuchten Filme (bis ca. 20 nm), so dass die detektierten Diffusionstrajektorien als zweidimensionale Projektionen eines dreidimensionalen Diffusionsprozesses interpretiert werden können. Entsprechend werden auch bei der Datenanalyse alle beobachteten Diffusionsprozesse als zweidimensional behandelt. Grundlegende Aussagen und Überlegungen zur Trajektorienanalyse und Spotgrößenanalyse sind bereits im Kapitel 3 enthalten.

Die mittlere quadratische Verschiebung $\langle \underline{r}^2(\tau) \rangle$ wird aus den Positionen $\underline{r}(t_i)$ der Moleküle entlang der Trajektorie berechnet (siehe Glg. 3.1). Gemäß der Einstein-Gleichung

$$\langle \underline{r}^2(\tau) \rangle = 4D\tau \quad (4.8)$$

kann aus der mittleren quadratischen Verschiebung durch lineare Regression ein Diffusionskoeffizient berechnet werden. Dazu wird eine gewichtete lineare Regression durchgeführt, bei der die einzelnen Datenpunkte mit dem Inversen der bei der Bestimmung der mittleren quadratischen Verschiebung auftretenden Varianz gewichtet werden. Zur Berechnung dieser Varianz werden wie im Abschnitt 3.3 die in der Arbeit von Saxton [113] angegebenen Formeln (Gleichung 2.45)

¹¹Als Kriterium ob ein Molekül mobil oder immobil ist, wird die Fläche A_{Traj} des minimalen Rechtecks benutzt, das die Schwerpunkte der Moleküle für alle Punkte der Trajektorie enthält. Als Trajektorien mobiler (diffundierender) Moleküle werden Trajektorien mit $A_{Traj} > 50 \text{ Pixel}^2$ ausgewählt. Als mit hoher Wahrscheinlichkeit immobil können Moleküle mit $A_{Traj} < 10 \text{ Pixel}^2$ angesehen werden. Alle anderen Moleküle werden wiederum getrennt behandelt.

benutzt. Der so berechnete Diffusionskoeffizient wird im Folgenden als D_{MSD} bezeichnet. Die Berechnung von Diffusionskoeffizienten aus Trajektorien endlicher Länge ist stets mit einer Unsicherheit behaftet, die bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen ist (siehe Abschnitt 3.3).

Bei sorgfältiger Beobachtung der diffundierenden Moleküle ist zu erkennen, dass die Diffusionsbewegung der Moleküle immer wieder durch Perioden unterbrochen wird, in denen sich die Position der Moleküle nicht ändert (Attachments). Bei der Datenauswertung werden diese Attachments erfasst als Perioden, in denen die relative quadratische Änderung der Position des Moleküls $\delta r^2 = (\underline{r}_i - \underline{r}_{i-1})^2$ für mehr als zwei Zeitschritte unter $1/10$ liegt (gemessen in Pixeleinheiten). Dieser Wert entspricht der Lokalisierungsgenauigkeit der Moleküle bei einem SNR von 10. Die untere Grenze von drei Zeitschritten für die Dauer einer Attachment-Periode soll sicherstellen, dass nicht fälschlicherweise Perioden, in denen sich Moleküle sehr langsam bewegen, als Attachments identifiziert werden. Die Gesamtdauer der Attachment-Perioden T_{att} wird für alle Trajektorien berechnet und mit der Gesamtlänge der Trajektorie T_{Traj} verglichen. Der so ermittelte Attachment-Parameter $c_{att} = T_{att}/T_{Traj}$ ist dann ein Maß, wie stark Attachmentprozesse den Diffusionsprozess beeinflussen. Weiterhin wird die Häufigkeit von Attachments einer bestimmten Länge und der mittlere Abstand zwischen zwei Attachment-Perioden erfasst.

Schließlich werden für alle Punkte einer Trajektorie Diffusionskoeffizienten aus der Spotgröße berechnet (siehe Abschnitt 3.4). Dazu wird zunächst die mittlere Spotgröße A_0 der immobilen Moleküle (die in beinahe jeder Messung zu beobachten sind) berechnet, die ein Maß für die Beugungsverbreiterung bei der Abbildung auf die Kamera ist. Aus dem aus Computersimulationen gewonnenen Zusammenhang

$$D_{SSA} = 3 \frac{A - A_0}{T_E} \quad (4.9)$$

kann dann der Diffusionskoeffizient D_{SSA} für die an jedem Punkt der Trajektorie bestimmte Spotgröße A ermittelt werden (T_E ist die Belichtungszeit der Kamera). Die Größe $A - A_0$ ist dann der Anteil der Spotgröße, der zusätzlich zur Beugungsverbreiterung, aus der Verbreiterung der Spots durch die Diffusionsbewegung der Moleküle stammt.

Kapitel 5

Analyse von Diffusionsprozessen in Flüssigkeitstropfen mittels Fluoreszenzburstanalyse

5.1 Vorarbeiten

Bei den in diesem Kapitel beschriebenen Experimenten handelt es sich um erste experimentelle Zugänge zur Diffusionsanalyse mit Einzelmolekültechniken unter Bedingungen, wie sie für Benetzungsexperimente typisch sind. Vorarbeiten mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie zeigten bereits, dass am Rand von Ethylenglykoltröpfchen die Diffusion von gelösten Farbstoffmolekülen deutlich langsamer als im Tropfeninneren erfolgt (Abb. 5.1).

Unter den im Folgenden beschriebenen experimentellen Bedingungen erlaubt die Korrelationsspektroskopie jedoch keine quantitative Analyse der Diffusionsprozesse. Die am Rand benetzender Tropfen gewonnenen Korrelationskurven lassen sich im Rahmen der vorhandenen Theorie nicht eindeutig analysieren. Deshalb wurden weitere Experimente mittels Fluoreszenzburstanalyse durchgeführt.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

Um die Funktion des experimentellen Aufbaus und der Datenanalyse zu überprüfen, wurden zunächst Referenzmessungen an großen Volumina von hochverdünnten Lösungen von Rhodamin 6G in Wasser und Ethylenglykol (je 10^{-12} mol/l)

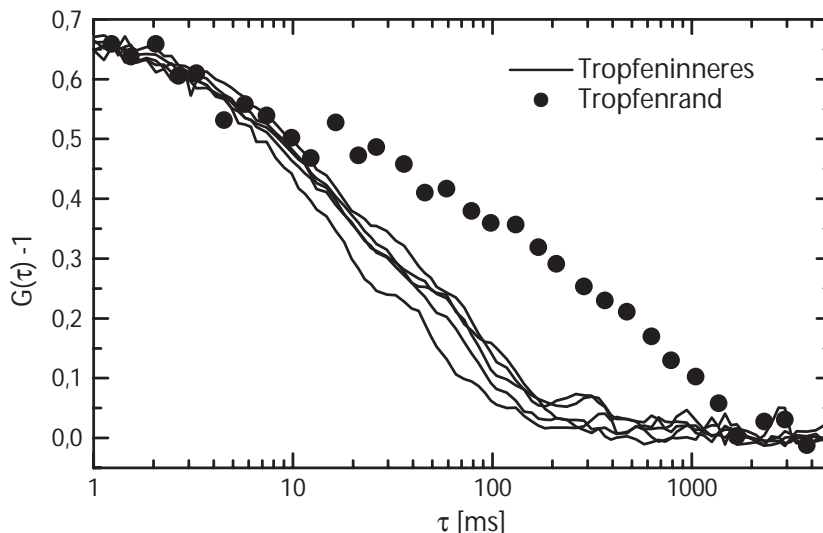


Abbildung 5.1: *Ergebnisse der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie am System Glycerin/Rhodamin 6G. Die am Tropfenrand gemessene Korrelationsfunktion weist eine deutlich größere Zeitkonstante auf, was auf eine Verlangsamung der Diffusion der Farbstoffe hinweist.*

durchgeführt. Dabei wurde sichergestellt, dass die Messungen in großer Entfernung (> 0.1 mm) von der Quarz/Flüssigkeits-Grenzfläche durchgeführt wurden. Die charakteristischen Diffusionszeiten wurden zu $\tau_D = 1.1 (\pm 0.2)$ ms für Ethylenglykol und $\tau_D = 70 (\pm 50)$ μ s für Wasser bestimmt¹. Mit dem zu $\omega_0 = 320$ nm bestimmten Radius des konfokalen Spots ergeben sich die Diffusionskonstanten zu $D_{Wasser} = 2.5 (\pm 1.7) \times 10^{-6}$ cm²/s und $D_{EGly} = 1.6 (\pm 0.3) \times 10^{-7}$ cm²/s. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit dem von Rigler et al. [30] angegebenen Diffusionskoeffizienten von $D = 2.8 \times 10^{-6}$ cm²/s für Rhodamin 6G in Wasser und dem nach der Stokes-Einstein-Beziehung (Glg. 2.18) zu erwartenden Verhältnis der Diffusionskoeffizienten von Rhodamin 6G in Wasser und Ethylenglykol das dem der Viskositäten von $\eta_{EGly}/\eta_{Wasser} = 18.9$ entsprechen sollte.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Substrat am System Rhodamin 6G/Ethylenglykol untersucht. Dazu wurden Zeitreihen der Fluoreszenzintensität im Tropfeninneren (Position A), an

¹Die Messungen an Wasser wurden mit einer Integrationszeit von 0.1 ms durchgeführt, was zu einer sehr großen Unsicherheit der Bestimmung von τ_D führt, da die charakteristische Diffusionszeit hier kürzer als die Integrationszeit ist. Eine kürzere Integrationszeit konnte aus technischen Gründen nicht realisiert werden.

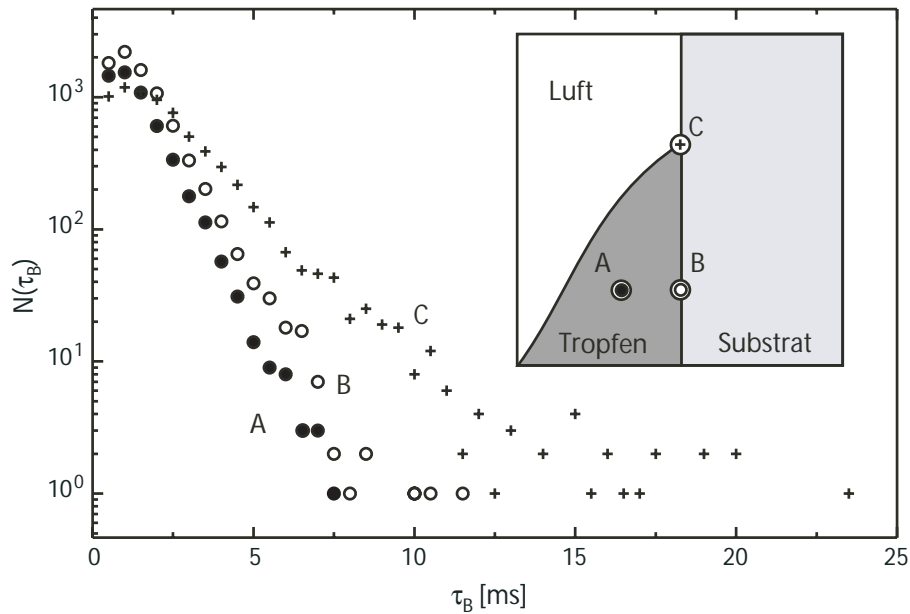


Abbildung 5.2: *An verschiedenen Positionen im Tropfen und am Tropfenrand gemessene Burstlängenstatistiken.*

der Grenzfläche in großer Entfernung vom Tropfenrand (Position B) sowie unmittelbar am Tropfenrand (Position C) aufgezeichnet. In Abbildung 5.2 sind die an den verschiedenen Positionen ermittelten Burstlängenstatistiken und die Lage der verschiedenen Messpunkte im Tropfen dargestellt.

Die an den einzelnen Messpunkten ermittelten Werte für die charakteristische Diffusionszeit und die daraus resultierenden Diffusionskoeffizienten sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Die Messungen zeigen deutlich, dass in der Nähe der Flüssigkeits/Substrat-Grenzfläche die charakteristischen Diffusionszeiten, verglichen mit den im Tropfeninneren ermittelten Werten, größer werden. Für die an der Position C gemessene Burstlängenverteilung ist außerdem zu erkennen, dass bei sehr großen Werten der Burstlänge noch eine zweite Komponente der Verteilung zu beobachten ist, die einer sehr langen charakteristischen Diffusionszeit ($\tau_D \approx 10$ ms) zuzuordnen ist. Die Vergrößerung der charakteristischen Diffusionszeiten ist wenig ausgeprägt an der Position B, während sie unmittelbar am Tropfenrand (Position C) deutlich ausgeprägt ist. Offenbar ist also in der Nähe der Glasoberfläche die Diffusion der Farbstoffmoleküle deutlich verlangsamt. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass mit dem hier beschriebenen Aufbau Bursts von Molekülen beobachtet wer-

Position	τ_D [ms]	D [cm ² /s]
A	1.1 ± 0.2	$1.6 (\pm 0.3) \times 10^{-7}$
B	1.3 ± 0.2	$1.4 (\pm 0.3) \times 10^{-7}$
C	2.0 ± 0.4	$8.8 (\pm 0.3) \times 10^{-8}$

Tabelle 5.1: Übersicht der Ergebnisse

den, die sich in einer Flüssigkeitsschicht befinden, die, über die Ausdehnung des Fokus gemittelt, deutlich dicker als 100 nm ist. Es ist also davon auszugehen, dass nur ein kleiner Teil der beobachteten Fluoreszenzbursts von Molekülen in der Nähe der Substratoberfläche stammen. Dieser Anteil wird an der Position B deutlich kleiner sein als an der Position C, an der die Flüssigkeit nur einen Teil des Fokalvolumens ausfüllt (Abb. 5.2). Die an diesen Positionen erfassten Messwerte müssen also als eine Mittelung von oberflächennaher und oberflächen-ferner Diffusion interpretiert werden. Daraus ist zu schließen, dass die Diffusion in unmittelbarer Nähe der Oberfläche noch deutlich langsamer sein muss, als durch die an den Positionen (B) und (C) ermittelten Diffusionskoeffizienten angegeben wird.

Tatsächlich ist die Situation jedoch komplizierter. Sollten tatsächlich zwei deutlich verschiedene charakteristische Diffusionskonstanten (Moleküle im Tropfeninneren und in der Nähe der Grenzfläche) existieren, so würde man an der Position C eine biexponentielle Verteilung der Burstlängen erwarten, bei der die schnellere Komponente den gleichen Anstieg, wie die Verteilung an der Position A aufweist. Das wird jedoch nicht beobachtet. Wenn man die an der Position C gemessene Verteilung als biexponentiell interpretiert, ergibt sich für die schnellere Komponente stets ein geringerer Anstieg. Dies kann eigentlich nur so interpretiert werden, dass am Tropfenrand die Diffusion für alle beobachteten Moleküle verlangsamt ist. Das kann z.B. dadurch verursacht werden, dass sich die Farbstoffmoleküle am Tropfenrand vorzugsweise in der Nähe der Grenzflächen aufhalten und kaum Moleküle aus dem Bereich zwischen den Grenzflächen detektiert werden.

An den hier gemessenen Verteilungen der Burstlängen ist die in den Computersimulationen beobachtete Zunahme der Ereignisse für sehr kurze Burstlängen, verglichen mit einer Exponentialverteilung, nicht zu erkennen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Detektionswahrscheinlichkeit für sehr kurze und zudem

wenig intensive Bursts stark abnimmt, so dass die experimentell bestimmten Verteilungsfunktionen in diesem Bereich wenig aussagekräftig sind.

Mit den hier vorgestellten Ergebnissen vergleichbare experimentelle Ergebnisse werden in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit beschrieben [129]. Dort wurde mit Korrelationsspektroskopie und Fluoreszenzburstanalyse die laterale Diffusion von farbstoffmarkierten Oligonucleotiden an einer Grenzfläche untersucht. Dabei wurden ebenfalls neben exponentialverteilten Burstlängen auch Bursts mit sehr hoher Dauer, deren Burstlängenverteilung deutlich von der Exponentialverteilung abweicht, gefunden. Die Autoren konnten diese langen Bursts durch transiente Adsorptionsprozesse der diffundierenden Moleküle erklären. Diese Ergebnisse und die in den folgenden Kapiteln gezeigten Beobachtungen legen nahe, dass auch bei den hier beschriebenen Experimenten solche Adsorptionsprozesse zur Verlangsamung der Diffusion in der Nähe von Grenzflächen beitragen.

5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzburstanalyse ein für die Analyse von normalen Diffusionsprozessen geeignetes Werkzeug ist. Es wird jedoch auch deutlich, dass die Aussagekraft der Fluoreszenzburstanalyse sehr begrenzt ist, wenn komplexere Diffusionsmechanismen auftreten.

Am Rand von Ethylenglykol-Tropfen, die ein Quarzsubstrat partiell benetzen, wird eine signifikante Verlangsamung der Diffusion von in der Flüssigkeit gelösten Rhodamin 6G Molekülen beobachtet. Diese Verlangsamung der Diffusion kann als Ergebnis der Wechselwirkung der Farbstoffmoleküle mit Grenzflächen interpretiert werden. Die verwendete Methode erlaubt jedoch keine Aussagen darüber, welcher Art die Prozesse sind, die zur Verlangsamung der Diffusion führen. Um weitere Informationen aus den gemessenen Daten zu extrahieren, wäre eine aufwändige Modellbildung nötig, die nicht zwingend zu eindeutigen Aussagen führt.

Eine weitergehende Analyse des Diffusionsprozesses der Farbstoffmoleküle in Oberflächennähe wurde deshalb nicht mit der in diesem Abschnitt beschriebenen experimentellen Methode durchgeführt. Die in den folgenden Abschnitten dargestellten Methoden der Videomikroskopie erlauben eine wesentlich detailliertere Untersuchung von Diffusionsprozessen. Weitere Experimente wurden deshalb mit

diesen Methoden durchgeführt.

Zusammenfassende Darstellungen der in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente sind in [130, 131] veröffentlicht.

Kapitel 6

Analyse von Diffusionsprozessen in ultradünnen Flüssigkeitsfilmen mittels Videomikroskopie

Dieses Kapitel befasst sich mit der Untersuchung von Diffusionsprozessen in ultradünnen Flüssigkeitsfilmen auf Quarzoberflächen. An unterschiedlichen Proben wird sowohl die Diffusion im Precursorlayer am Rand benetzender Tropfen als auch die Diffusion in ausgedehnten Filmen definierter Dicke untersucht. Mittels Einzelmolekülvideomikroskopie (Single Molecule Tracking) werden Bilderserien einzelner Farbstoffmoleküle in diesen Flüssigkeitsfilmen aufgezeichnet, die sowohl mit der etablierten Trajektorienanalyse (Berechnung der mittleren quadratischen Verschiebung - MSD) als auch mit der Spotgrößenanalyse (Spot Size Analysis - SSA) ausgewertet werden. Damit bietet sich auch die Möglichkeit, die Ergebnisse beider Analysemethoden an identischen Datensätzen zu vergleichen.

6.1 Ergebnisse und Diskussion

6.1.1 Experimente am Rand benetzender Tropfen

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente wurden an farbstoffdotierten Tröpfchen aus TEHOS (Tetrakis(2-ethylhexoxy)-silan) und PDMS (Polydimethylsiloxan), die auf Quarzsubstraten deponiert wurden, durchgeführt. Die hier besprochenen Trajektorien einzelner diffundierender Moleküle wurden au-

ßerhalb des makroskopisch sichtbaren Tropfenrandes aufgezeichnet. Die Experimente wurden mit Anregungsleistungen von 1 mW und Belichtungszeiten von 50 bis 80 ms durchgeführt. Dabei wurden Bilderserien aus jeweils 500 Bildern aufgezeichnet. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (18° C) durchgeführt.

Beobachtung diffundierender und immobilisierter Moleküle

Beobachtet man den Rand eines mit Rhodamin 6G dotierten TEHOS-Tropfens (Probe DT-R) im Weitfeldmikroskop, ist eine hohe Zahl von Fluoreszenzspots zu erkennen, die zum Tropfeninneren hin soweit zunimmt, dass keine isolierten Spots mehr zu erkennen sind. Unmittelbar am Tropfenrand nimmt die Zahl der Spots deutlich ab (Abbildung 6.1). Der überwiegende Teil der Spots stammt von Molekülen, die ihre Position über lange Zeit nicht ändern, also offenbar auf der Oberfläche immobilisiert sind. Ein Teil der Spots zeigt aber auch die für die Diffusion typische Zufallsbewegung. Sowohl die mobilen als auch die immobilen Spots zeigen das für einzelne Moleküle typische Verhalten, also plötzliches Verschwinden der Intensität (digitales Photobleichen) und Intensitätsschwankungen, bei denen die Intensität bis auf den Wert der Untergrundintensität sinkt und danach wieder den ursprünglichen Wert erreicht (Einzelmolekül-Blinken). Damit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den hier beobachteten Spots tatsächlich um die Abbilder der Fluoreszenz einzelner Rhodamin 6G - Moleküle handelt.

Entfernt man sich nun um ca. 0.1 mm vom makroskopischen Tropfenrand, was im total reflektierten Anregungslicht leicht beobachten werden kann, sinkt die Anzahl der Fluoreszenzspots deutlich ab, so dass im Mittel nur etwa 10 bis 20 Spots im Bildbereich sind (Abbildung 6.1). Auch hier beobachtet man wieder das typische Einzelmolekülverhalten (digitales Photobleichen, Blinken) sowie diffundierende und immobile Moleküle. Wird nun ein Bereich der Probe über längere Zeit beleuchtet, so werden immer weniger immobile Moleküle beobachtet, da diese sukzessive photobleichen. Es werden jedoch immer wieder diffundierende Moleküle beobachtet, die in den Bildbereich eintreten und schließlich ebenfalls photobleichen oder den Bildbereich verlassen. Diffundierende Moleküle findet man zu einer Zeit von 0.5 h nach Deposition der Tropfen in einer Entfernung von bis zu einem Millimeter vom Tropfenrand. Für deutlich größere Entfernungen vom makroskopischen Tropfenrand wurden keine diffundierenden Moleküle

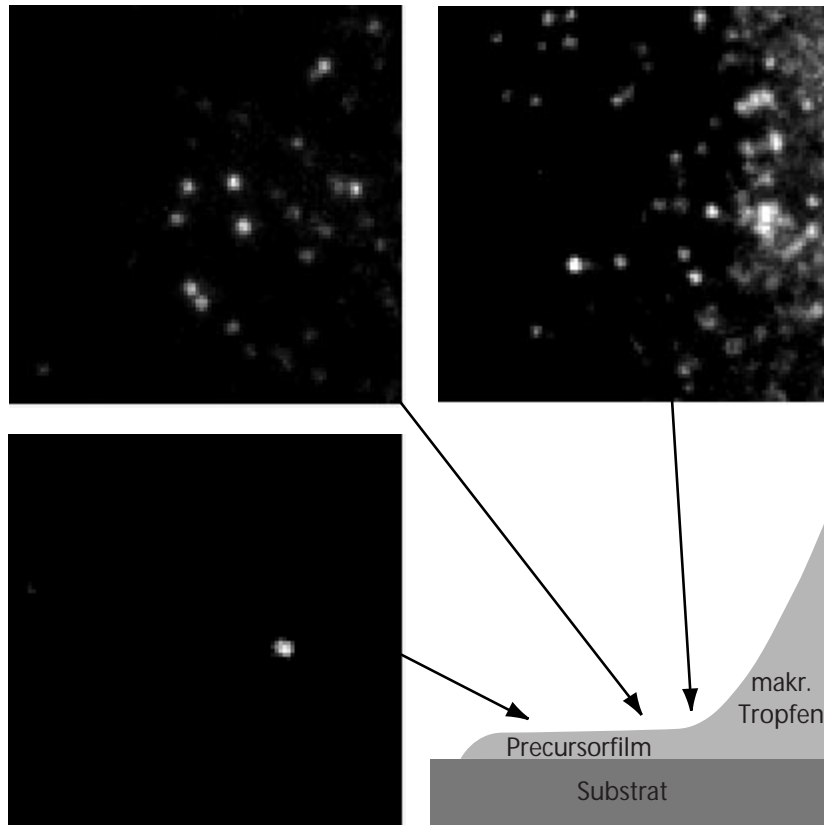


Abbildung 6.1: Momentaufnahmen der Fluoreszenz aus unterschiedlichen Bereichen am Rand eines mit R6G dotierten TEHOS-Tropfens (oben rechts: unmittelbar am Tropfenrand, oben links: ca. 0.1 mm vom Tropfenrand entfernt, unten links: ca. 1 mm vom Tropfenrand entfernt, Bildausschnitt 100×100 Pixel, 13×13 Mikrometer).

beobachtet.

Es ist also davon auszugehen, dass es sich bei den außerhalb des Tropfenrandes diffundierenden Molekülen um Moleküle handelt, die sich im Precursorlayer befinden, der sich um den makroskopischen Tropfen ausbreitet und unter den gegebenen experimentellen Bedingungen eine Dicke von etwa 1 nm aufweisen sollte¹. Ein weiteres Indiz, dafür, dass es sich hier um einen sehr dünnen Flüssigkeitsfilm handelt, ist die Tatsache, dass mit zunehmender Entfernung vom Tropfenrand

¹Auf Siliziumsubstraten, die mit einer dünnen Siliziumdioxid-Schicht bedeckt sind, beobachtet man Precursorfilme, deren Dicke sowohl bei TEHOS, als auch bei PDMS, etwa 1 nm beträgt [16, 20, 52, 54, 58]. Da die chemische Zusammensetzung einer Quarzglas-Oberfläche der von oxidierten Si-Substraten entspricht, sollte auch die Dicke des Precursorfilms vergleichbar sein, denn diese wird im Wesentlichen durch die Grenzflächenenergien der beteiligten Grenzflächen bestimmt.

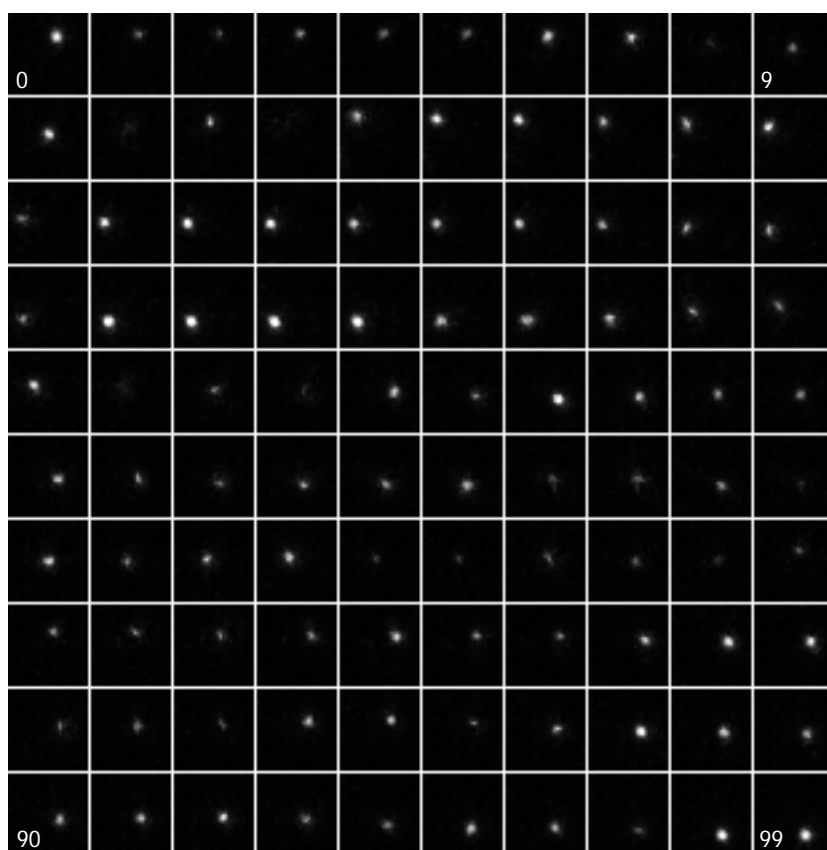


Abbildung 6.2: Ausschnitte aus einer Bilderserie von 100 Bildern von einem im Precursorlayer diffundierenden R6G - Molekül. Die Bilder sind in der zeitlichen Folge von links oben nach rechts unten angeordnet. Die Belichtungszeit beträgt 50 ms (Bildausschnitt: 4×4 Mikrometer).

die Flächenkonzentration deutlich abnimmt, bis nur noch eines oder sehr wenige Moleküle im Bildbereich sind (Abbildung 6.1).

Auch nach sehr langer Zeit (ca. 10 min Beleuchtung des Probenbereichs) beobachtet man immer wieder das kurze Aufblinken von immobilen Molekülen. Das lässt darauf schließen, dass das Photobleichen kein irreversibler photochemischer Prozess ist, sondern dass es sich eher um sehr langlebige Dunkelzustände handelt.

Einzelne diffundierende Moleküle können teilweise über sehr lange Zeiten beobachtet werden. Abbildung 6.2 zeigt die Beobachtung eines einzelnen diffundierenden Moleküls über 100 Einzelbilder bei einer Belichtungszeit von 50 ms. Die Gesamtdauer dieser Beobachtung beträgt 5 s. Der größte Teil der beobachteten Trajektorien hat eine Länge von 20 bis 40 Einzelbeobachtungen, es wurden

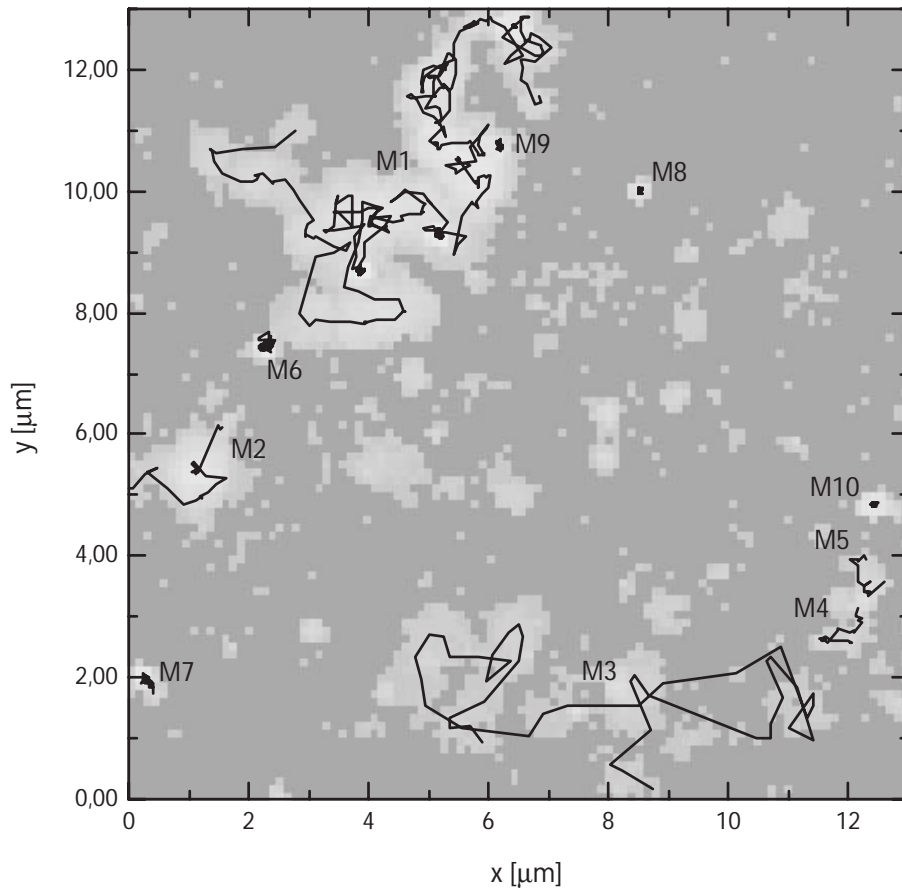


Abbildung 6.3: *Summation der Einzelbilder einer Serie aus 500 Bildern im Vergleich mit den durch Bildverarbeitungstechniken ermittelten Trajektorien der Moleküle (Belichtungszeit Einzelbild: 50 ms)*

aber auch zahlreiche Trajektorien mit einer Länge von mehr als 100 Punkten beobachtet. In Abbildung 6.2 sind ebenfalls die für die Beobachtung einzelner diffundierender Moleküle typischen Intensitätsschwankungen zu erkennen.

Die Trajektorien einzelner diffundierender Moleküle können sichtbar gemacht werden, indem man die Intensitäten für alle Bilder einer Videosequenz aufsummiert. Die Trajektorien sind dann als helle Spuren im Bild zu erkennen während immobile Moleküle als helle punktförmige Objekte erscheinen. Diese Darstellung erlaubt es, die Ergebnisse der Bildverarbeitungsprozesse, mit denen Trajektorien aus den Bildserien extrahiert werden, direkt mit den aufgezeichneten Bildserien zu vergleichen (Abbildung 6.3). Die Darstellung lässt vermuten, dass vereinzelt

(z.B. Molekül M3) die Trajektorien aus der Bildverarbeitung an Stellen erscheinen, die im überlagerten Bild dunkel sind. Durch sorgfältige Analyse der Videosequenzen lässt sich aber nachweisen, dass an all diesen Stellen tatsächlich Moleküle detektiert werden, die aber eine geringe Intensität aufweisen und damit in der summierten Darstellung nicht sichtbar sind. Ferner ist zu erkennen, dass die Spuren der diffundierenden Moleküle (z.B. M1) teilweise deutlich verbreitert, verglichen mit den Spots der immobilisierten Moleküle (z.B. M8), sind. Dies ist auf die Diffusionsbewegung der Moleküle während der Belichtungszeit zurückzuführen. Im summierten Bild sind auch helle Strukturen zu erkennen, denen durch die Bildverarbeitung keine Trajektorien zugeordnet werden. Dabei handelt es sich um Moleküle, die nur kurze helle Perioden, unterbrochen durch lange Dunkelperioden, aufweisen und denen somit keine Trajektorien zugeordnet werden können. Die Trajektorien der Moleküle M1 (diffundierend) und M9 (immobilisiert) können in der Summationsdarstellung nicht unterschieden werden. Da diese Moleküle aber zu unterschiedlichen Zeiten sichtbar sind, ist es der Bildverarbeitungssoftware möglich, die Trajektorien zu trennen. Die Trajektorienstücke M3, M4 und M5 gehören wahrscheinlich zu einem Molekül und sind lediglich durch Dunkelperioden des Moleküls unterbrochen - es ist jedoch nicht möglich, das sicher zu entscheiden, weshalb derartige Trajektorienstücke als getrennte Trajektorien behandelt werden.

Attachments

Beobachtet man die diffundierenden Moleküle auf dem Bildschirm, erkennt man, dass die Diffusionsbewegung der Moleküle immer wieder durch Perioden unterschiedlicher Länge unterbrochen wird, in denen sich die Position der Moleküle nicht ändert (Attachment). Abbildung 6.4 zeigt dies am Beispiel eines Ausschnitts der Trajektorie von Molekül M1 (aus Abbildung 6.3). Aufgetragen sind die beobachtete Intensität und die relative quadratische Entfernung $\delta r^2 = (\underline{r}_i - \underline{r}_{i-1})^2$ vom vorherigen Punkt entlang der Trajektorie. Die meisten beobachteten Attachment-Perioden sind sehr kurz, es werden jedoch auch sehr lange Attachment-Perioden, die bis zu einigen Sekunden dauern, beobachtet. Insgesamt machen die beobachteten Attachment-Perioden ca. 15 % der Gesamtdauer der Trajektorie aus. Als Ursache dieser Attachment-Perioden kommen temporäre Bindungen der Moleküle an die Oberfläche in Frage. Es kann davon ausgegan-

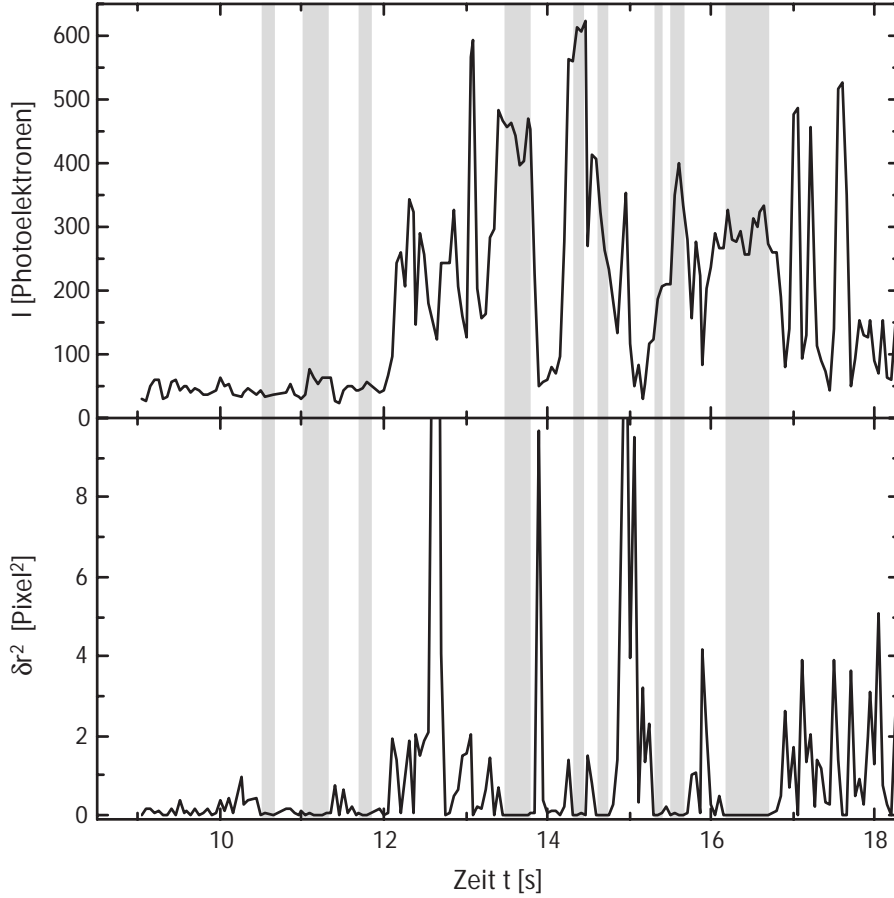


Abbildung 6.4: Intensität I (oben) und relative quadratische Entfernung δr^2 (unten) entlang der Trajektorie eines diffundierenden Moleküls. Grau unterlegt sind Perioden, in denen sich die Position des Moleküls nicht ändert.

gen werden, dass der gleiche Prozess, der zu den temporären Attachments führt, auch die Ursache für die Existenz vollständig immobilisierter Moleküle ist, die in den dünnen Flüssigkeitsfilmen häufig beobachtet werden. Ebenso wie extrem lange Attachment-Perioden beobachtet werden, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch zahlreiche kurze Attachment-Perioden auftreten, deren Länge unterhalb der Belichtungszeit der CCD-Kamera liegen und die deshalb experimentell nicht aufgelöst werden können.

Die Annahme, dass die Moleküle während der Attachment-Perioden an die Oberfläche gebunden sind, wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass die Fluoreszenzintensität der Moleküle während der Attachment-Perioden weitgehend konstant bleibt, während sie in Phasen freier Diffusion sehr starken Schwan-

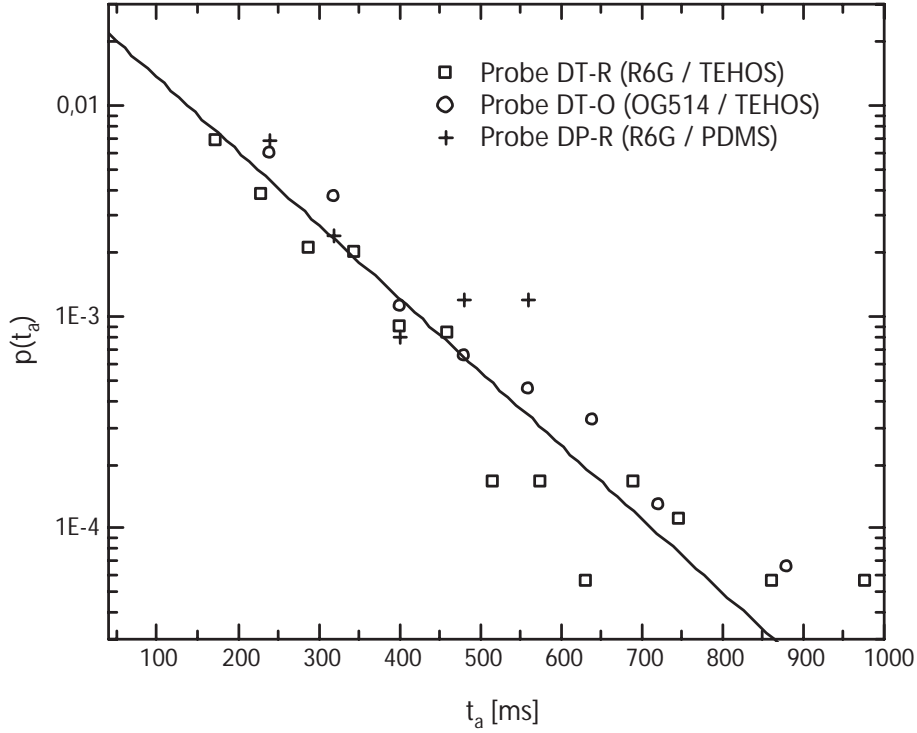
kungen unterliegt (Abbildung 6.4, Probe DT-R). Dieses Verhalten kann erklärt werden, wenn man annimmt, dass sich der Anregungsdipol der Moleküle während der Attachment-Perioden in einer festen Lage relativ zur Polarisierung des Anregungslichts befindet, in Perioden freier Diffusion dagegen frei beweglich ist. Auch wenn die Fluoreszenzintensität des Moleküls in Abbildung 6.4 starken Schwankungen unterliegt (von 20 bis 600 Photoelektronen), so liegt sie jedoch immer deutlich über der Detektionsschwelle, die hier 11 Photoelektronen beträgt.

Es handelt sich bei den Schwankungen der Fluoreszenzintensität also keinesfalls um experimentell bedingtes Rauschen, vielmehr enthalten diese Intensitätsschwankungen Informationen über die Orientierung des Moleküls und seinen photophysikalischen Zustand, die an Hand der an diesem System gemessenen experimentellen Daten nicht voneinander getrennt werden können, da keine polarisationsaufgelöste Fluoreszenzdetektion durchgeführt wurde.

Betrachtet man die Verteilungsfunktion $p(t_a)$ der Länge der Attachment-Perioden t_a (Abbildung 6.5) für Trajektorien aus verschiedenen Proben (Proben DT-R, DT-O und DP-R), ist ein exponentieller Abfall der Häufigkeit mit zunehmender Länge der Attachments zu beobachten. Im Rahmen der experimentellen Genauigkeit kann für diese Proben nicht näher bestimmt werden, ob die Verteilung mono- oder multiexponentiell ist. Unter der Annahme einer monoexponentiellen Verteilungsfunktion $p(t_a) = p_0 \exp(-t_a/\tau_a)$ ergibt sich eine charakteristische Zeitkonstante τ_a von 130 ± 30 ms. Abbildung 6.5 zeigt auch, dass es im Rahmen der experimentellen Genauigkeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Farbstoffen Rhodamin 6G (ionisch) und Oregon Green 514 (nicht ionisch) und zwischen den Flüssigkeiten TEHOS (Viskosität $\eta = 6.8 \cdot 10^{-3}$ Pa s) und PDMS (Viskosität $\eta = 5 \cdot 10^{-2}$ Pa s) gibt. Die Dicke der Precursorlayer ist ebenfalls in beiden Fällen vergleichbar und beträgt ca. 1 nm [16, 20, 52, 54, 58]. Die Statistik der Attachment-Perioden wird also eher durch die Oberfläche des Substrats als durch die Farbstoffe oder die Flüssigkeiten bestimmt.

Nimmt man an, dass es sich bei den Attachments der Farbstoffmoleküle um temporäre Bindungen an die Oberfläche handelt, ist es bei Kenntnis der mittleren Dauer der Attachments möglich, die Tiefe des Bindungspotentials abzuschätzen. Für einen aktivierten Prozess beschreibt ein Arrheniusgesetz

$$R = f_S \exp(-\Delta E/k_B T) \quad (6.1)$$



Abbildungung 6.5: Verteilungsfunktion der Attachmentdauer t_a für verschiedene Proben. Die durchgezogene Linie beschreibt eine Exponentialverteilung mit einer charakteristischen Zeitkonstante von 130 ms.

die Abhängigkeit der Desorptionsrate R von der Potentialtiefe ΔE (k_B ist die Boltzmannkonstante, T die Temperatur). Der Frequenzfaktor f_S hat in Flüssigkeiten typischerweise einen Wert von 10^{12} s^{-1} (Zahl der molekularen Stöße). Mit $R = 1/\tau_a$ ergibt sich näherungsweise eine Potentialtiefe von $26 k_B T$, also etwa 0.7 eV. Dieser Wert weist darauf hin, dass es sich um relativ stabile Bindungen handeln muss, typische Werte der Potentialtiefe für van der Waals Bindungen liegen bei einigen 10 meV, für kovalente Bindungen bei einigen eV.

Messungen der Diffusionskonstanten

Für die in den verschiedenen Proben detektierten Trajektorien wurden die mittlere quadratische Verschiebung $\langle \underline{r}^2(t) \rangle$ sowie die Diffusionskoeffizienten D_{MSD} und die dazugehörigen Fehler (Streuung σ) berechnet. Einige Beispiele für Trajektorien, die an der Probe DT-R gemessen wurden, zeigt Abbildung 6.6. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich für unterschiedliche Trajektorien sehr unterschiedliche Verläufe von $\langle \underline{r}^2(t) \rangle$ und damit auch eine sehr breite Verteilung von

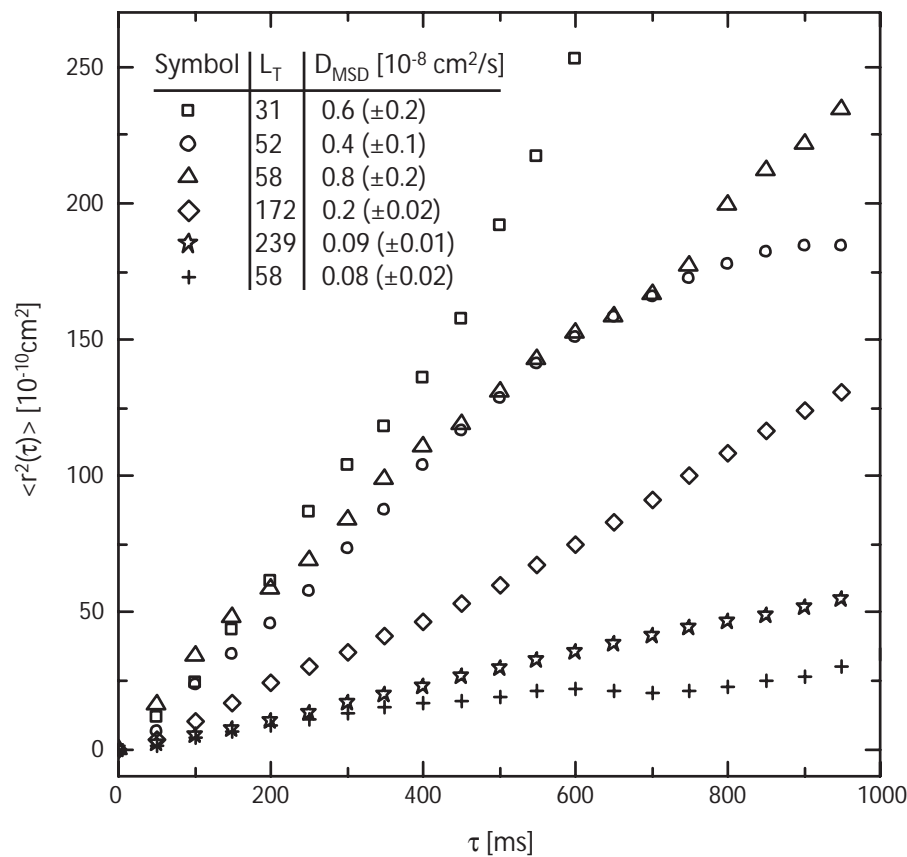


Abbildung 6.6: Mittlere quadratische Verschiebung für verschiedene Trajektorien (Probe DT-R). Zusätzlich ist für jede Trajektorie der Diffusionskoeffizient D_{MSD} sowie die Länge der Trajektorie L_T angegeben.

Diffusionskoeffizienten ergeben.

Die Verteilung der an den verschiedenen Proben gemessenen Diffusionskoeffizienten ist in Abbildung 6.7 wiedergegeben. Die beobachtete Verteilung der Diffusionskoeffizienten ist deutlich breiter, als die durch die experimentelle Unsicherheit bei der Bestimmung der Diffusionskoeffizienten gegebene Verteilung.

Schätzt man mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 2.18) den Diffusionskoeffizienten von Rhodamin 6G in TEHOS und PDMS ab², so erhält man mit $D = 3.7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ für TEHOS und $D = 5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ für PDMS Werte, die deutlich über den hier beobachteten Diffusionskoeffizienten liegen. Da der Farbstoff Oregon Green eine mit der von Rhodamin 6G vergleichbare Grö-

²Diese Abschätzung geht von einem Wert des Diffusionskoeffizienten von Rhodamin 6G in Wasser von $D = 2.8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Die Viskositäten von TEHOS und PDMS sind um einen Faktor 7.6 (TEHOS) bzw. 56.2 (PDMS) größer als die von Wasser.

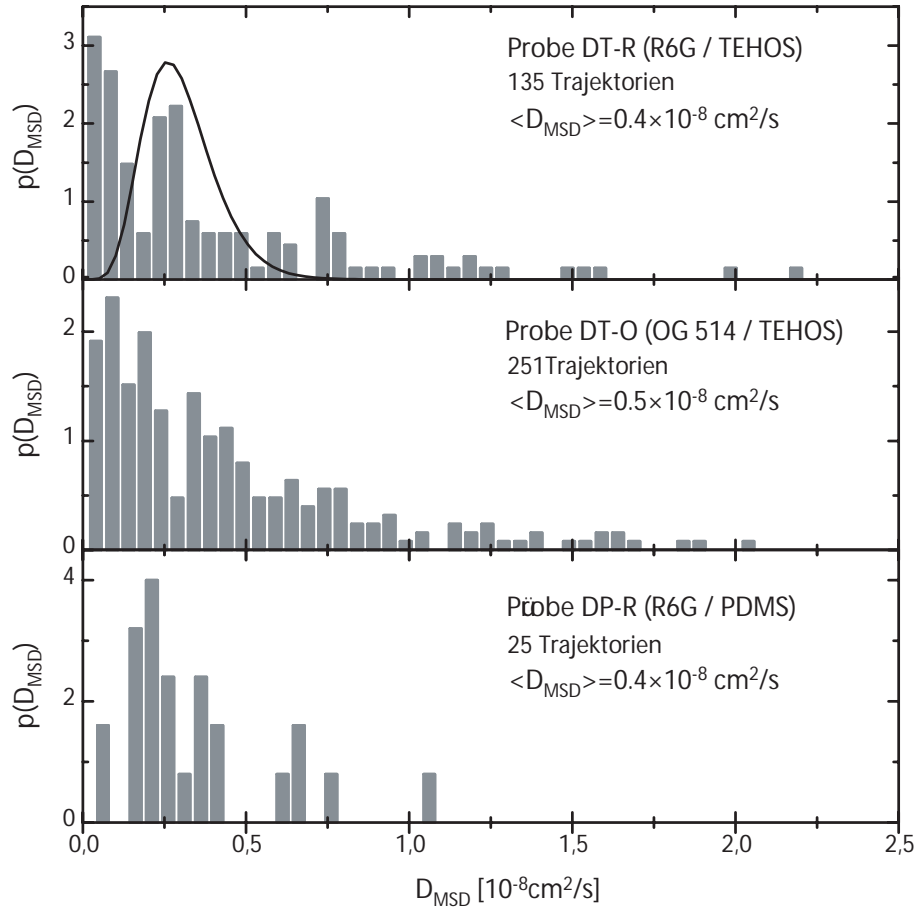


Abbildung 6.7: Verteilung der Diffusionskoeffizienten D_{MSD} für verschiedene Proben. Die durchgezogene Linie gibt die Verteilungsfunktion auf Grund der experimentellen Unsicherheit für $L_T = 20$ und $\bar{D} = 0.25 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ wieder.

ße hat, sind für Oregon Green ähnliche Werte für den Diffusionskoeffizienten der freien Diffusion³ zu erwarten. Für Farbstoffe in einfachen Flüssigkeiten (nahezu kugelförmige Moleküle) ist die Stokes-Einstein-Beziehung meist gut erfüllt (siehe Abschnitt 5.2 und [31]). Zumindest für TEHOS sollte die Stokes-Einstein-Beziehung also einen guten Näherungswert des Diffusionskoeffizienten der freien Diffusion liefern. Schwieriger ist die Situation für PDMS, bei dem es sich um eine Polymerschmelze, also sicher keine einfache Flüssigkeit handelt.

Festzustellen ist also, dass die Diffusion im Precursorlayer für den Fall von TEHOS um mehr als eine Größenordnung langsamer ist, als der Wert des Diffu-

³Unter freier Diffusion soll hier die Diffusion in makroskopisch ausgedehnten Flüssigkeitsvolumina und unter der Abwesenheit jeglicher Grenzflächen verstanden werden.

sionskoeffizienten der freien Diffusion. Zusätzlich wird eine sehr breite Verteilung von Diffusionskoeffizienten beobachtet, d. h. unter Berücksichtigung der Genauigkeit, mit der die einzelnen Diffusionskoeffizienten bestimmt wurden, ist es nicht möglich, alle an einer Probe beobachteten Trajektorien mit einem einheitlichen Diffusionskoeffizienten zu beschreiben. Eine Ursache für die drastische Verlangsamung der Diffusion sind sicherlich die temporären Bindungen der Moleküle an die Oberfläche. Entfernt man die detektierten Attachment-Perioden aus den Trajektorien und berechnet erneut die mittlere quadratische Verschiebung $\langle x^2(\tau) \rangle$ und daraus korrigierte Diffusionskoeffizienten, so ergeben sich geringfügig (um ca. 10 %) höhere Werte der Diffusionskoeffizienten für die meisten Trajektorien. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Detektion und Entfernung der Attachment-Perioden unvollständig ist, da Attachment-Perioden, deren Länge in der Größenordnung der Belichtungszeit bzw. darunter liegt, nicht detektiert und somit auch nicht aus den Trajektorien entfernt werden können. Für einige Messreihen wurde exemplarisch eine Extrapolation der Verteilungsfunktion der Attachmentdauer (Exponentialverteilung) zu sehr kurzen Werten der Attachmentdauer durchgeführt. Berücksichtigt man diese möglicherweise nicht detektierten Attachmentperioden und berechnet damit eine korrigierte Diffusionskonstante, so erhält man maximal einen um einen Faktor 2 gegenüber der ursprünglichen Diffusionskonstante vergrößerten Wert. Allein durch die Attachmentperioden kann die Verlangsamung der Diffusion im Precursorlayer um mehr als eine Größenordnung gegenüber dem Wert der freien Diffusion also nicht erklärt werden.

6.1.2 Experimente an dünnen TEHOS-Filmen

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden an ultradünnen Flüssigkeitsfilmen auf Quarzsubstraten (Probe FQ-17: 17 nm, Probe FQ-3: 3 nm, Probe FSi-17: 17 nm). Die Experimente wurden (soweit nicht anders erwähnt) bei Anregungsleistungen von 12 mW durchgeführt. Wie zuvor wurden jeweils Bilderserien aus jeweils 500 Bildern mittels Einzelmolekülvideomikroskopie aufgezeichnet. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (18° C) durchgeführt.

Spotgrößenanalyse

An ultradünnen Flüssigkeitsfilmen wurden erstmals Experimente zur Bestimmung von Diffusionskonstanten mittels Spotgrößenanalyse (SSA) durchgeführt. Die Spotgrößen werden durch Anpassung der experimentell beobachteten Spots an eine zweidimensionale Gaußverteilung berechnet. Zusätzlich wurden auch die Trajektorien diffundierender Moleküle mit der Trajektorienanalyse, bei der Diffusionskonstanten aus der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) berechnet werden, analysiert. Spotgrößenanalyse und Trajektorienanalyse werden jeweils an den gleichen Einzelmolekültrajektorien durchgeführt.

Auch in ultradünnen Flüssigkeitsfilmen werden neben den diffundierenden stets auch immobilisierte Moleküle beobachtet, für die ebenfalls die Spotgrößen berechnet werden. In Abbildung 6.8 ist eine Momentaufnahme zu sehen, auf der gleichzeitig ein diffundierendes und ein immobilisiertes Molekül zu erkennen sind. Bereits mit bloßem Auge ist zu erkennen, dass das Abbild des diffundierenden Moleküls deutlich verbreitert gegenüber dem des immobilisierten erscheint. Die ebenfalls in der Abbildung gezeigten Intensitätsprofile durch die Spots wurden hier exemplarisch mit Anpassungen an eine Gaußverteilung $I = I_{bg} + I_o \exp(-x^2/(2\sigma^2))$ analysiert, wobei sich Gaußbreiten von $\sigma = 4.21$ Pixel (550 nm) für das diffundierende Molekül und von $\sigma = 1.28$ (170 nm) Pixel für das immobilisierte Molekül ergeben.

Abbildung 6.9 zeigt die Verteilung der bei einer großen Zahl von Einzelbeobachtungen gemessenen Spotgrößen A für unterschiedliche Belichtungszeiten. Die Messungen wurden bei konstanter Anregungsleistung und für zwei Proben mit unterschiedlicher Dicke der Flüssigkeitsfilme (FQ-17: 17 nm und FQ-3: 3 nm) durchgeführt. Bei den Messungen können durch die Bildverarbeitungssoftware diffundierende und immobilisierte Moleküle unterschieden und getrennt analy-

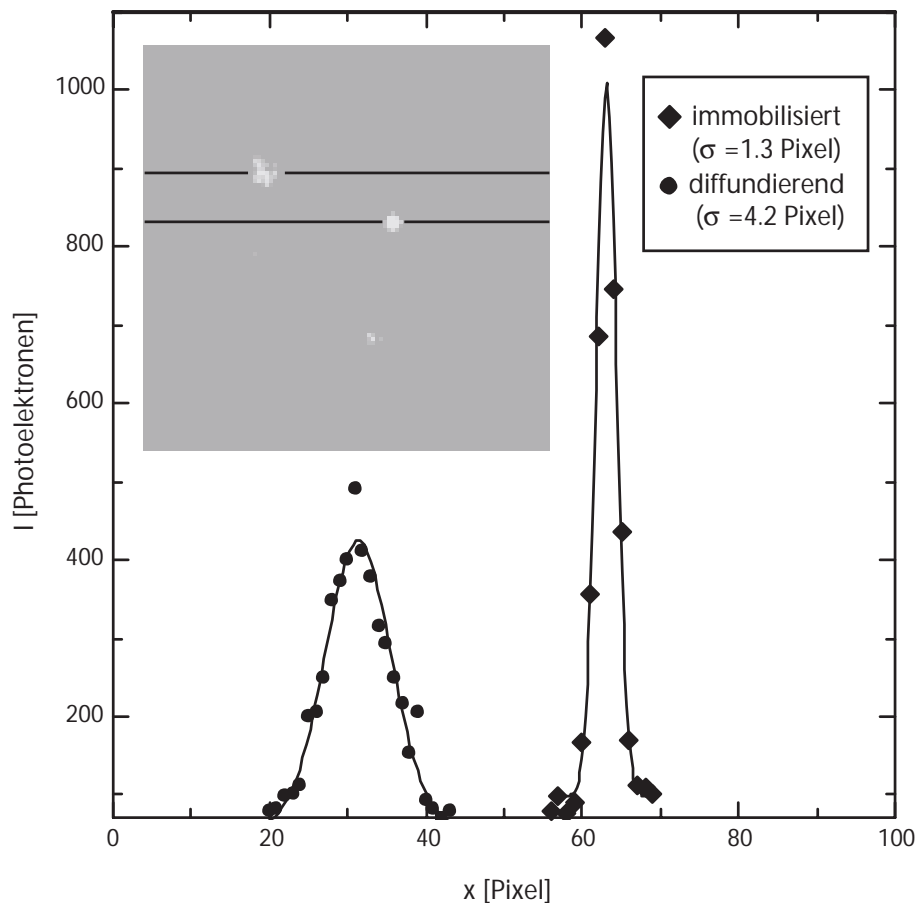


Abbildung 6.8: Momentaufnahme von einem diffundierenden und einem immobilisierten Molekül (Bildgröße 13×13 Mikrometer) und die dazugehörigen Intensitätsprofile (Symbole) entlang der im Bild eingezeichneten Linien. Die durchgezogenen Linien geben Anpassungen an eine Gaußverteilung wieder.

siert werden.

Für beide Proben ist deutlich eine Verschiebung der Spotgrößen mit wachsender Belichtungszeit zu erkennen. Ebenfalls ist zu erkennen, dass diese Verschiebung für die im dünneren Film (Probe FQ-3) gemessenen Spotgrößen deutlich geringer ausfällt. Vergleicht man die Spotgrößen der immobilen Moleküle für die beiden Messungen, so ist festzustellen, dass die Verteilung für den dünneren Film zu kleineren Werten der Spotgröße verschoben und auch schmäler ist. Diese Verschiebung ist durch eine Neujustage des Aufbaus zwischen den Experimenten an den beiden Proben begründet. Durch den Justagezustand des Mikroskops wird die Übertragungsfunktion der optischen Abbildung und damit auch die beugungslimitierte Breite der Spots beeinflusst.

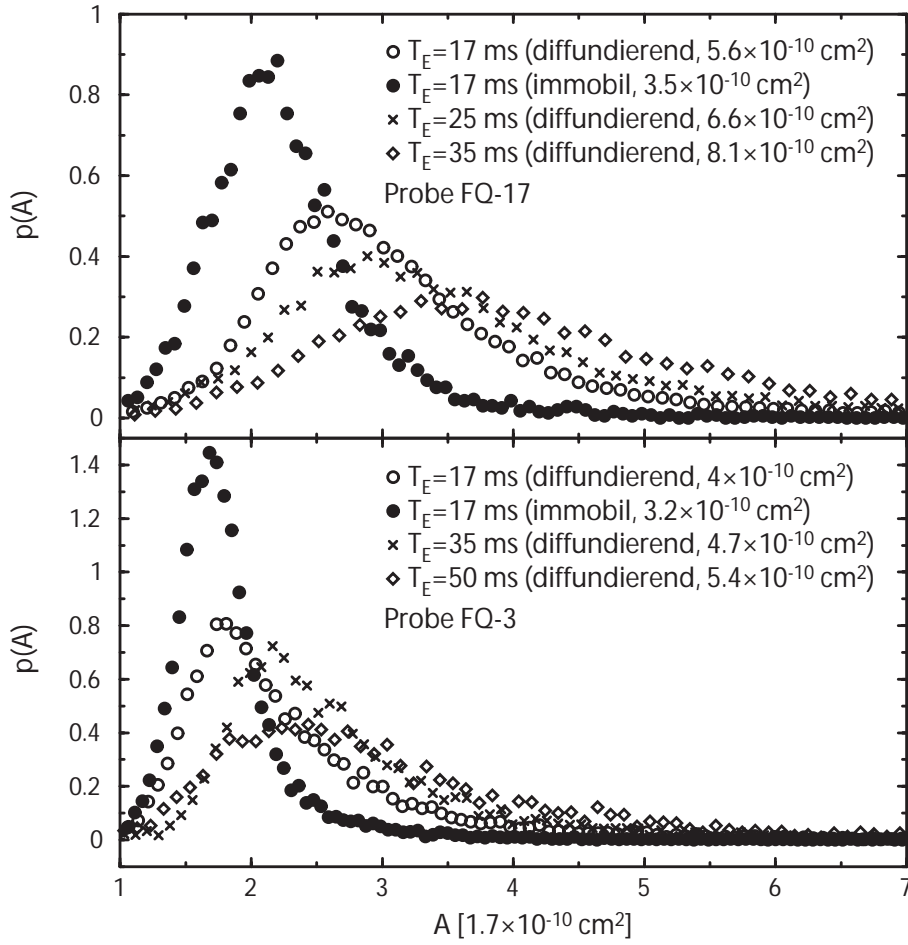


Abbildung 6.9: Verteilung der Spotgrößen diffundierender und immobilisierter Moleküle für zwei verschiedene Proben bei unterschiedlichen Belichtungszeiten. In Klammern sind jeweils die Mittelwerte der Spotgröße angegeben.

Die Spotgrößen der immobilisierten Moleküle zeigen eine leichte Zunahme mit zunehmender Belichtungszeit und Anregungsleistung. Dabei ändern sich die Werte um ca. 10 % bei Variation von Anregungsleistung bzw. Belichtungszeit um eine Größenordnung. Die Zunahme der Spotgrößen der diffundierenden Moleküle bei zunehmender Belichtungszeit ist aber deutlich größer, so dass die Spotgrößenanalyse von diesem Effekt kaum beeinflusst wird.

In Abbildung 6.10 sind für beide untersuchte Proben die mittleren Spotgrößen der diffundierenden Moleküle über der Belichtungszeit aufgetragen. Für die Probe FQ-17 (Filmdicke 17 nm) wurden Experimente zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (innerhalb von 6 h nach der Präparation und 96 h nach der Präparati-

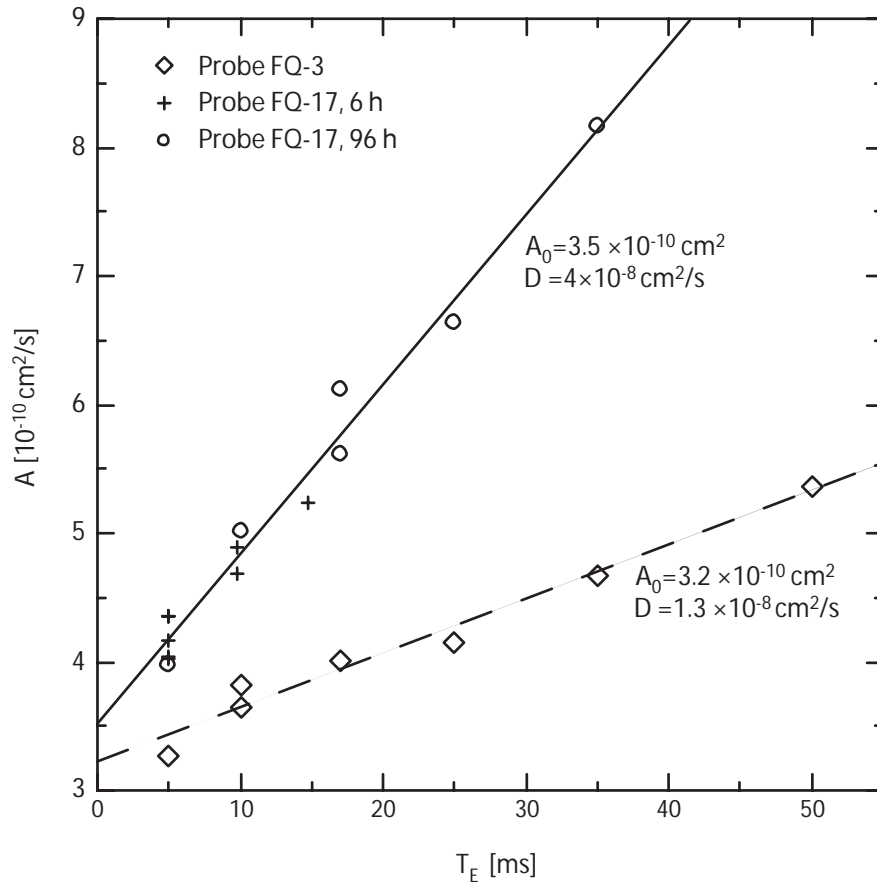


Abbildung 6.10: Mittlere Spotgrößen in Abhängigkeit von der Belichtungszeit für zwei unterschiedliche Proben. Die eingezeichneten Linien sind Ergebnisse der linearen Regression, deren Ergebnisse ebenfalls angegeben sind.

on) durchgeführt, die in der Abbildung unterschiedlich gekennzeichnet sind. Die Daten für die unterschiedlichen Proben folgen jeweils einem linearen Zusammenhang, der der Gleichung $A = A_0 + 0.33 D_{SSA} T_E$ genügt (siehe auch Abschnitt 3.4). Dabei liegen die Daten für beide Messungen an der Probe FQ-17 auf der gleichen Linie. Eine lineare Regression der Daten ergibt Werte von $A_0 = 3.5 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2$ und $D_{SSA} = 4 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ für die Probe FQ-17 bzw. $A_0 = 3.2 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2$ und $D_{SSA} = 1.3 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ für die Probe FQ-3. Die Daten für eine Messung an einer einzelnen Probe folgen also dem gleichen Zusammenhang, der auch die aus Computersimulationen (Abschnitt 3.4) ermittelten Spotgrößen diffundierender Moleküle beschreibt. Damit können den Spotgrößen Diffusionskonstanten

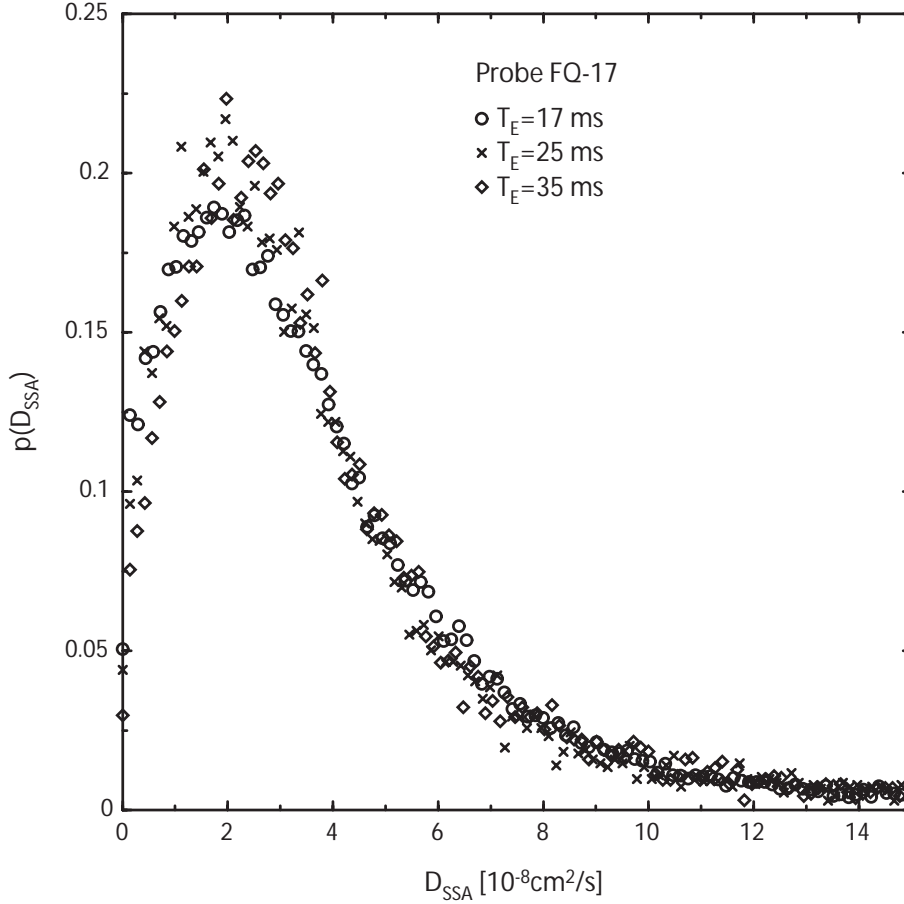


Abbildung 6.11: Verteilung der mittels Spotgrößenanalyse für die Probe FQ-17 ermittelten Diffusionskonstanten D_{SSA} für unterschiedliche Belichtungszeiten.

gemäß

$$D_{SSA} = (A - A_0)/(0.33T_E) \quad (6.2)$$

zugeordnet werden.

Abbildung 6.11 zeigt die Verteilungen der auf diese Weise an der Probe FQ-17 aus den Spotgrößen ermittelten Diffusionskonstanten D_{SSA} für unterschiedliche Belichtungszeiten. Diese Verteilungen zeigen eine sehr gute Übereinstimmung. Die Verteilungen werden bei $D_{SSA} = 0$ abgeschnitten, da die Berechnung der Spotgröße gemäß Gleichung 6.2 negative Werte der Diffusionskonstante ergeben kann, wenn die gemessene Größe des Spots kleiner als A_0 wird. Diese negativen Werte der Diffusionskonstante sind Ausdruck der experimentellen Unsicherheit bei der Bestimmung der Spotgröße, haben aber keine physikalische Bedeutung.

Computersimulationen zur Spotgrößenanalyse (Abschnitt 3.4) haben gezeigt, dass eine Mittelung über mehrere aufeinanderfolgende Messungen der Spotgröße entlang einer Trajektorie bzw. über die gesamte Trajektorie zu einer deutlichen Verschmälerung der Verteilung der ermittelten Diffusionskonstanten führt. Deshalb wurden auch für die Messungen an den beiden Proben Mittelungen der Spotgröße über jeweils 5 aufeinanderfolgende Beobachtungen (5-Punkt-Mittel) und über die gesamte Trajektorie (Trajektorienmittel) durchgeführt. Die entsprechenden Verteilungen der ungemittelten Ergebnisse der Spotgrößenanalyse, der 5-Punkt-Mittelwerte und der Trajektorienmittelwerte für die Probe FQ-17 werden in Abbildung 6.12 gezeigt. Es wird deutlich, dass die Mittelung hier lediglich zu einer Verschiebung der Verteilung, nicht aber zu einer deutlichen Verschmälerung führt. Daraus folgt, dass die Breite der Verteilung nicht durch die experimentelle Unsicherheit bei der Bestimmung der Diffusionskonstante bestimmt ist, sondern vielmehr das Ergebnis einer heterogenen Verteilung von Diffusionskonstanten in der untersuchten Probe ist.

Zusätzlich werden Ensemblemittelwerte $\langle D_{SSA} \rangle$ gebildet, indem wiederum über alle Messungen von D_{SSA} , über alle Ergebnisse der 5-Punkt-Mittelung bzw. über alle Ergebnisse der Trajektorienmittelung gemittelt wird. Diese Ensemblemittelwerte sind ebenfalls in Abbildung 6.12 angegeben. Während die Ensemblemittelung über die 5-Punkte-Mittelwerte den gleichen Mittelwert wie für die ungemittelten Daten liefert, weicht der Ensemblemittelwert über die trajektorien-gemittelten Diffusionskonstanten ab. Dies liegt daran, dass die Trajektorien eine unterschiedliche Länge aufweisen und somit auch unterschiedlich in die Berechnung des Ensemblemittelwertes eingehen. Für die Probe FQ-3 ergeben sich ähnliche Ergebnisse wobei die Ensemblemittelwerte der Diffusionskonstanten kleiner und die Verteilungen schmäler sind.

Vergleich mit der Trajektorienanalyse (MSD)

Vergleicht man für beide Proben die Ergebnisse der Spotgrößenanalyse (trajektorien-gemittelt) mit denen der Trajektorienanalyse (MSD), so ist wiederum in allen Fällen eine breite Verteilung von Diffusionskonstanten zu beobachten (Abbildung 6.13). Für beide Proben ist außerdem zu erkennen, dass die Spotgrößenanalyse generell größere Diffusionskonstanten ergibt, als die Trajektorienanalyse obwohl beide Methoden jeweils auf die gleichen Trajektorien angewendet werden. Für

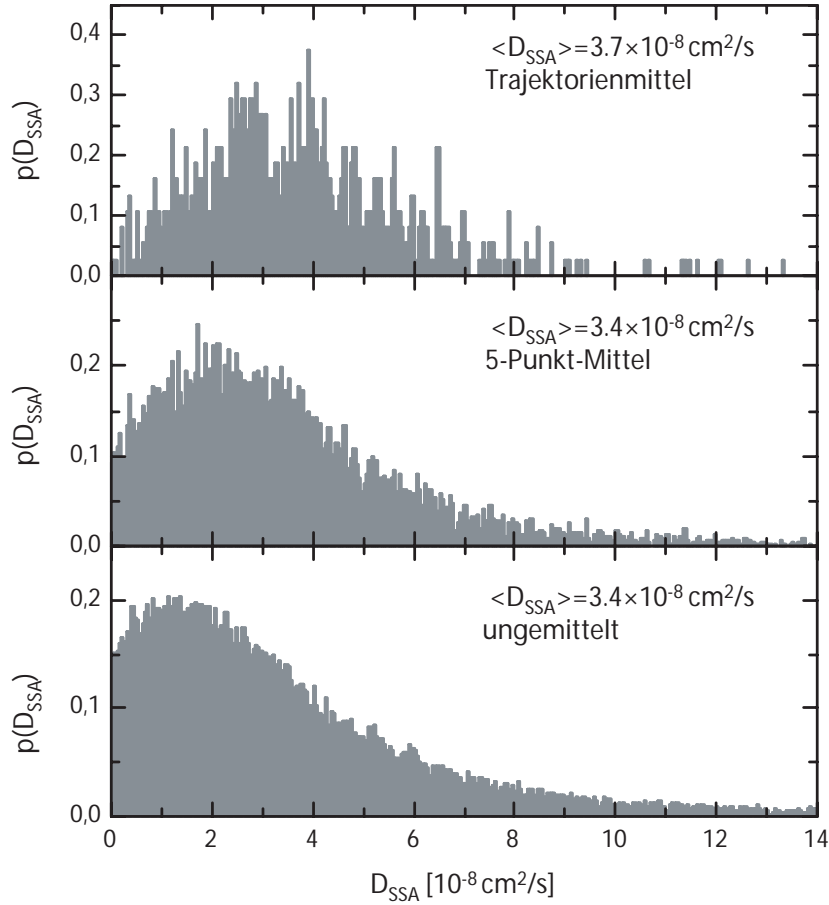


Abbildung 6.12: Vergleich der Ergebnisse der Spotgrößenanalyse ohne Mittelung (unten), nach Mittelung über 5 Punkte (Mitte) und nach Mittelung über die gesamte Trajektorie (oben) für die Probe FQ-17 (748 Trajektorien, $T_E = 17 \text{ ms}$). Die Ensemblemittelwerte über alle Trajektorien sind jeweils angegeben.

die Probe FQ-3 fällt der Unterschied zwischen den Ergebnissen der Spotgrößenanalyse und der Trajektorienanalyse allerdings wesentlich geringer aus als für die Probe FQ-17.

Weiterhin kann beobachtet werden, dass für den dickeren Film um einen Faktor 2 größere Diffusionskonstanten (bis zu $1.2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) beobachtet werden als für den dünneren Film (bis zu $6 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$). Für die Probe FQ-17 liegen die maximal beobachteten Werte der Diffusionskonstante bereits in der gleichen Größenordnung wie die Diffusionskonstante für die freie Diffusion ($3.7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$). Für beide Proben ergeben sich Diffusionskonstanten, die wiederum deutlich über denen liegen, die am Rand benetzender TEHOS-Tropfen, also im etwa 1 nm

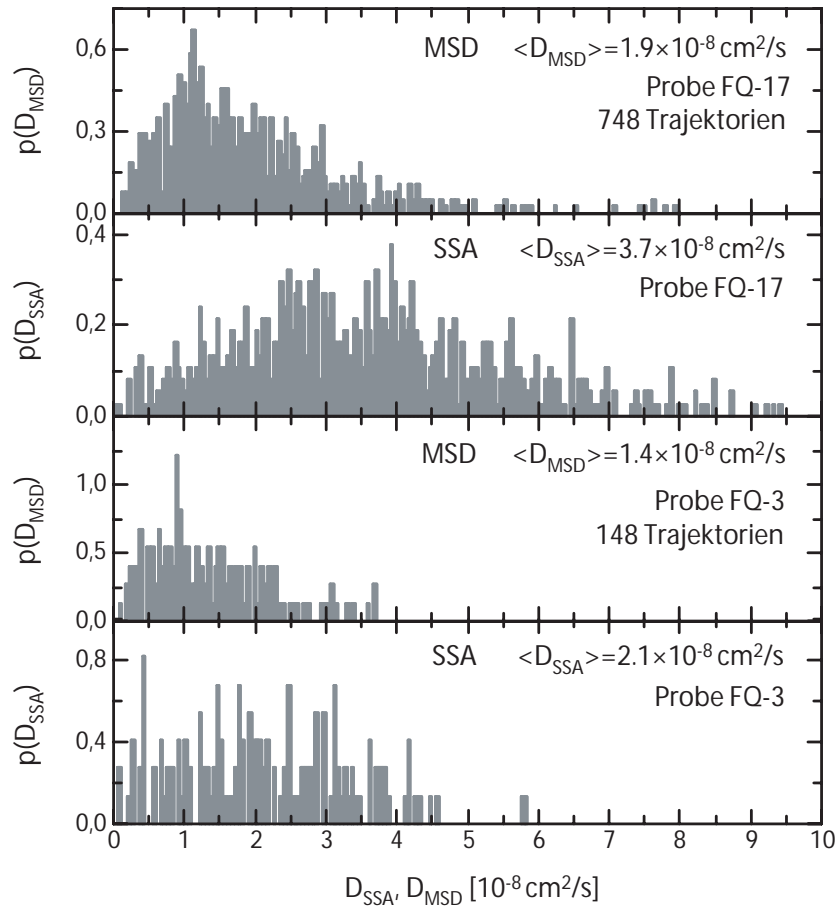


Abbildung 6.13: Verteilung der aus der Spotgrößenanalyse (Trajektorienmittel) und der MSD-Analyse ermittelten Diffusionskonstanten für die Proben FQ-17 und FQ-3.

dicken Precursorfilm, beobachtet wurden ($5 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$).

Die in Abbildung 6.13 dargestellten Verteilungsfunktionen sind repräsentativ für die Messungen an den beiden Proben. Alle anderen Ensembles von Trajektorien zeigen das gleiche Verhalten. Die beobachteten Unterschiede zwischen den in Abbildung 6.13 gezeigten Verteilungen sind also mit Sicherheit nicht das Ergebnis einer unterschiedlichen Größe der zugrundeliegenden Ensembles.

Damit ergibt sich folgendes Bild: Sowohl die Mittel- als auch die Maximalwerte der beobachteten Verteilung der Diffusionskonstanten wachsen deutlich mit zunehmender Dicke des TEHOS-Films. Die Minimalwerte der Diffusionskoeffizienten sind jedoch unabhängig von der Dicke der Filme, d. h. mit wachsender Filmdicke wächst auch die Breite der Verteilung der Diffusionskonstanten. Diese

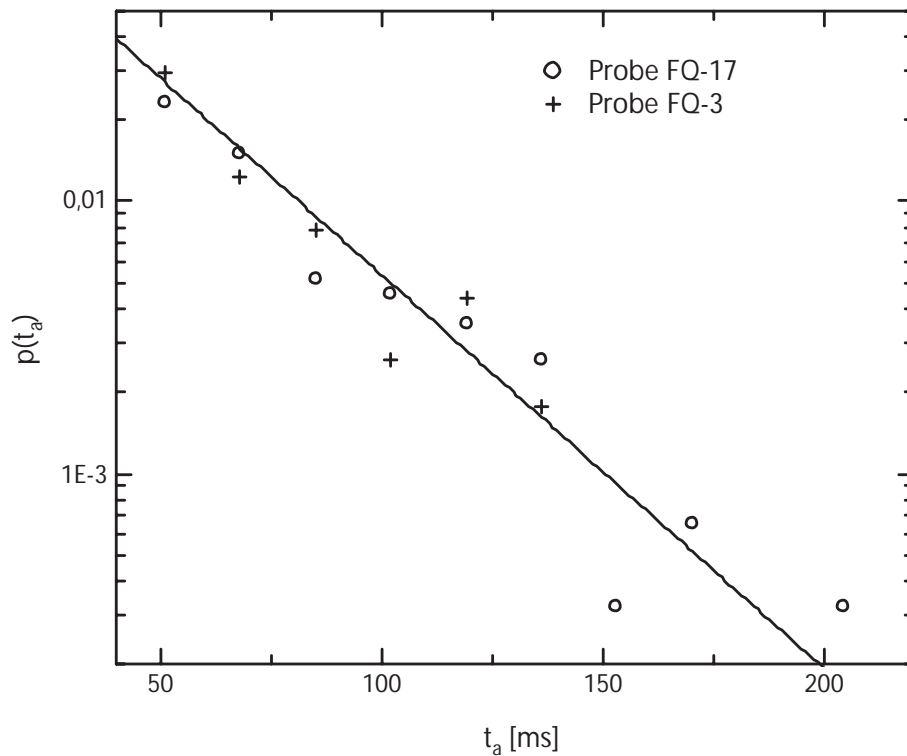


Abbildung 6.14: Verteilung der Dauer der Attachmentperioden für die Proben FQ-17 und FQ-3. Die durchgezogene Linie beschreibt eine Exponentialverteilung mit einer charakteristischen Zeitkonstante von 30 ms.

Beobachtung lässt sich erklären, wenn man annimmt, dass der Diffusionskoeffizient eine deutliche Abhängigkeit von der Entfernung der diffundierenden Moleküle zur Quarz-Oberfläche aufweist. In einem relativ dicken Film können die Moleküle häufiger in großer Entfernung von der Oberfläche diffundieren, während in den molekular dünnen Filmen die Trajektorien immer in der Nähe der Oberfläche verlaufen.

Attachments

Ebenso wie im Precursorfilm der benetzenden Tropfen werden auch an den Proben FQ-3 und FQ-17 temporäre Attachments der Moleküle an der Oberfläche mit unterschiedlicher Dauer beobachtet. Abbildung 6.14 zeigt die Verteilungen der Attachmentdauer t_a , die an den beiden untersuchten Proben beobachtet wurden. Die Verteilungen können näherungsweise durch eine exponentiell abfallende Funktion mit einer charakteristischen Zeitkonstante τ_a von 30 ± 10 ms beschrieben

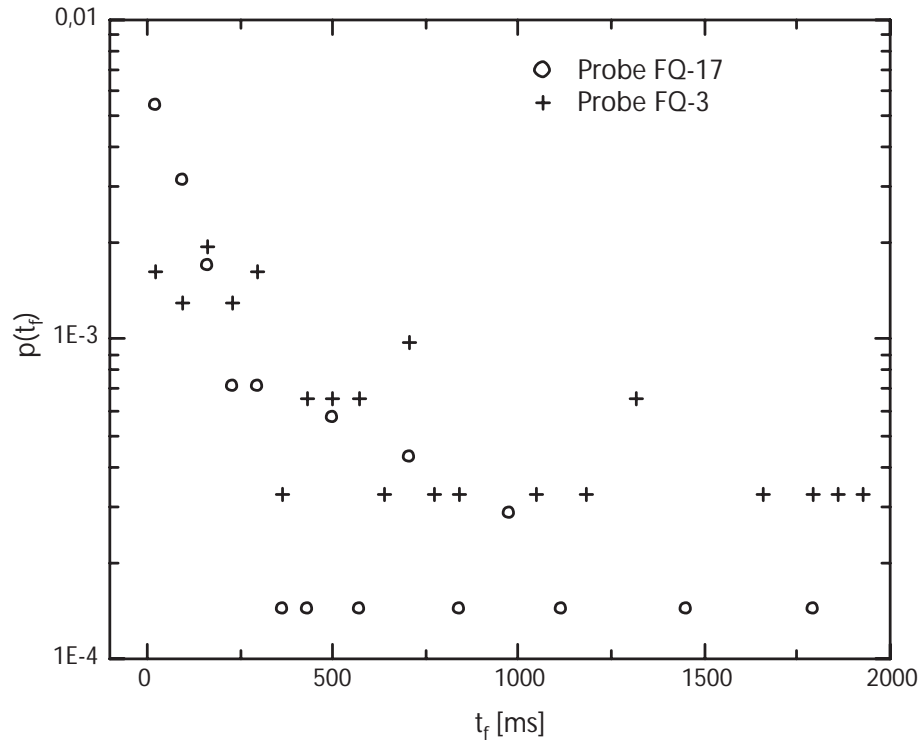


Abbildung 6.15: Verteilungsfunktion der Perioden zwischen zwei Attachments t_f für die Proben FQ-3 und FQ-17.

werden. Verglichen mit den Ergebnissen im Precursorfilm ergibt sich damit eine um einen Faktor 4 kürzere charakteristische Zeitkonstante τ_a . Berechnet man aus dieser charakteristischen Zeitkonstante wiederum die Tiefe eines dazugehörigen Bindungspotentials erhält man mit 630 m eV einen Wert, der gegenüber den Ergebnissen, die im Precursorlayer gewonnen wurden (0.7 eV), wenig verändert ist.

Zusätzlich wurden die Zeitintervalle t_f , die zwischen zwei Attachment-Perioden liegen, erfasst. Da dies nur bei Trajektorien möglich ist, die mindestens zwei Attachment-Perioden enthalten, ist die Zahl dieser Ereignisse relativ klein und die Aussagekraft ihrer Verteilung begrenzt. Abbildung 6.15 zeigt diese Verteilungsfunktion für die Proben FQ-3 und FQ-17. Es ist zu erkennen, dass diese Verteilung für den dickeren Film (FQ-17) zunächst wiederum näherungsweise monoexponentiell ist. Für längere Intervalle ist jedoch ein Abknicken der Verteilung (langsamer Abfall) zu beobachten. Für den dünneren Film (FQ-3) ist auf Grund der geringen Zahl der Ereignisse kein eindeutiger Verlauf der Verteilungsfunktion

zu erkennen. Es ist jedoch zu beobachten, dass längere Intervalle zwischen den Attachment-Perioden häufiger vertreten sind als im dickeren Film (FQ-17).

Intuitiv würde man zunächst erwarten, dass im dünneren Film (Probe FQ-3) der Abstand zwischen den Attachments kleiner ist als im dickeren Film (Probe FQ-17) wenn man annimmt, dass sich die Moleküle im dickeren Film weiter von der festen Oberfläche entfernen können und somit auch längere Zeit benötigen, um wieder zur Oberfläche zurückzukehren. Es muss also ein Mechanismus existieren, der im dünneren Film Moleküle, die sich von der Oberfläche entfernt haben, daran hindert, schnell wieder an die Oberfläche zurückzukehren. Einen möglichen derartigen Mechanismus stellt das Liquid Layering dar, das später diskutiert wird. Insgesamt ist die Statistik der Perioden zwischen den Attachments sehr komplex und kann nicht im Rahmen eines einfachen Modells analysiert werden.

Belichtungszeitabhängigkeit der Spotgrößenanalyse

Um Einflüsse der Intensität des Anregungslichts auf die Diffusion der Farbstoffe zu untersuchen, wurden Experimente mit unterschiedlicher Anregungsintensität (2.5 bis 30 mW) unter ansonsten unveränderten experimentellen Bedingungen (Probe, Belichtungszeit) durchgeführt.

Dabei zeigt sich, dass die Verteilungen der aus dem MSD ermittelten Diffusionskonstanten über den gesamten Intensitätsbereich keine signifikante Veränderung aufweisen. Damit kann eine Beeinflussung der Diffusion in den Filmen durch das Anregungslicht ausgeschlossen werden. Dagegen zeigt sich in der Verteilung der aus den Spotgrößen berechneten Diffusionskonstanten zunächst (bis etwa 12 mW) eine deutliche Verschiebung zu größeren Diffusionskonstanten mit wachsender Anregungsleistung, ab etwa 12 mW bleiben die Verteilungen jedoch konstant (Abbildung 6.16).

Dieses Verhalten ist das Ergebnis des mit wachsender Anregungsintensität ebenfalls zunehmenden Signal-Untergrund-Verhältnisses (SNR), welches bei einer Anregungsleistung von 2.5 mW im Mittel 5 beträgt und bei einer Anregungsleistung von 12 mW bereits auf einen Mittelwert von 9.6 gestiegen ist. Mit zunehmendem SNR können Details der diffusionsverbreiterten Spots besser aufgelöst werden, insbesondere die durch schnelle Diffusionsprozesse verursachten, sehr breiten, aber gleichzeitig flachen, Spots können deutlich vom Untergrund getrennt werden, während diese für niedrige Werte des SNR teilweise im Rau-

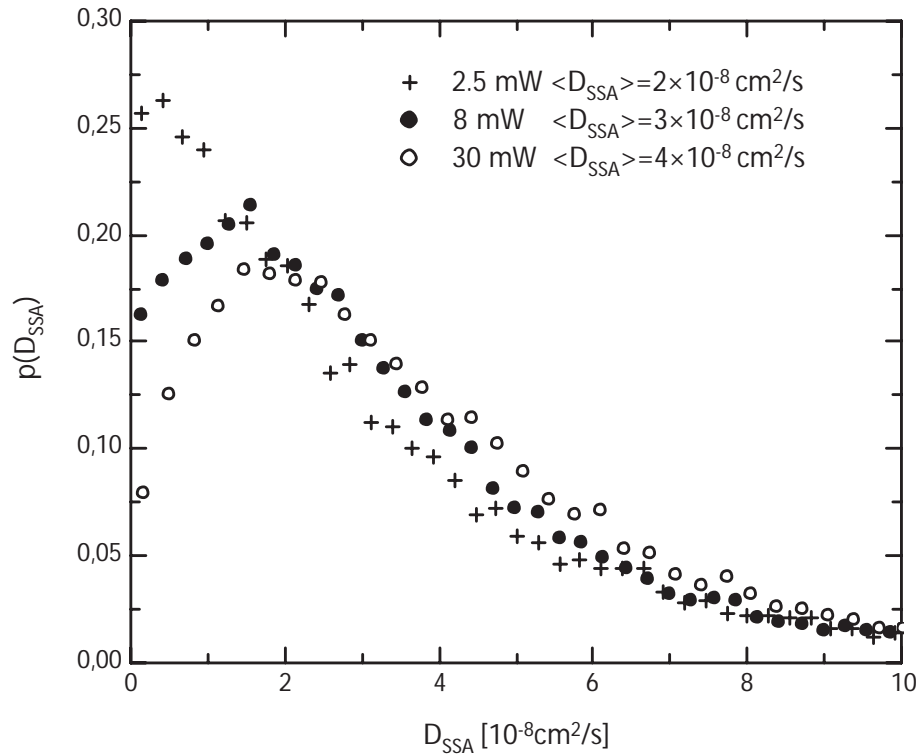


Abbildung 6.16: *Abhängigkeit der Ergebnisse der Spotgrößenanalyse von der Anregungsleistung (Probe FQ-17, $T_E = 17 \text{ ms}$).*

schen untergehen. Das führt dazu, dass für niedrige Werte des SNR tendenziell zu kleine Werte der Spotgröße gemessen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass offenbar ein Schwellwert des SNR existiert, ab dem die Spotgrößenanalyse optimal funktioniert. Dieser liegt für die hier beschriebenen Experimente bei einem Wert des SNR von 10.

Struktur der Verteilungen der Diffusionskonstanten

Durch die Ergebnisse der Computersimulationen (Abschnitte 3.3 und 3.4) und der in [113] angegebenen Ergebnisse ist es möglich, die beobachteten Verteilungen von Diffusionskonstanten mit der Verteilung von Diffusionskoeffizienten, die sich auf Grund der experimentellen Unsicherheit ergibt (Fehlerfunktion), zu vergleichen.

Abbildung 6.17 zeigt die Verteilung der aus der Spotgrößenanalyse ermittelten Diffusionskoeffizienten (einzelne Spots ohne Mittelung) für die Probe FQ-3 und die Fehlerfunktionen für vier verschiedene Diffusionskonstanten. Es wird

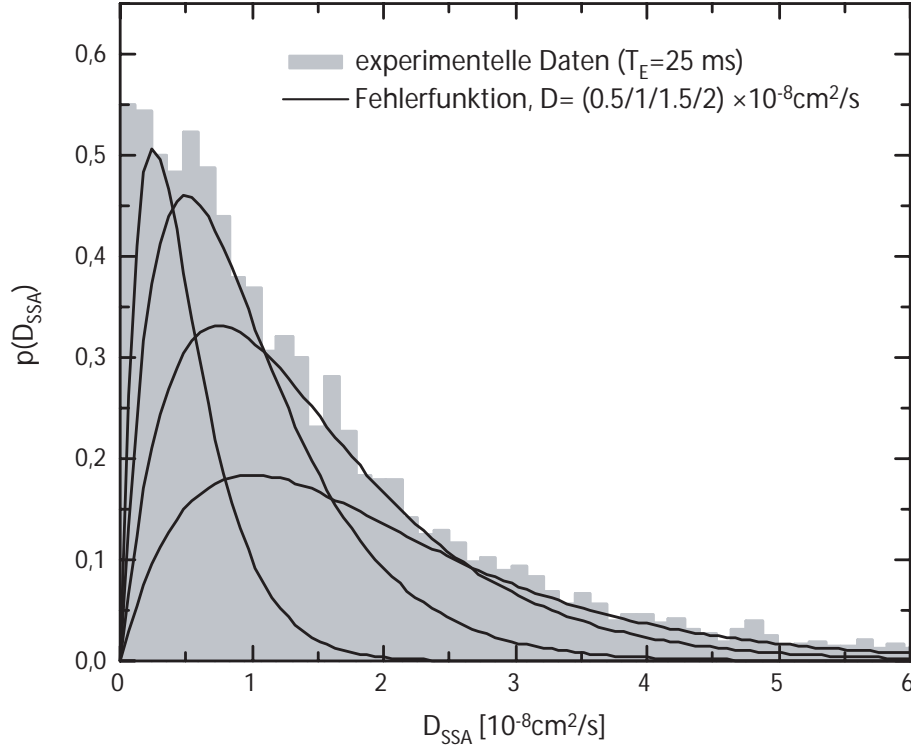


Abbildung 6.17: Vergleich der experimentellen Ergebnisse der Spotgrößenanalyse an der Probe FQ-3 (Balken) mit den Fehlerfunktion für verschiedene Diffusionskoeffizienten (durchgezogene Linien).

deutlich, dass die experimentell beobachtete Verteilung der Diffusionskonstanten an der Probe FQ-3 nicht durch eine einheitliche Diffusionskonstante beschrieben werden kann. Wie in Abbildung 6.17 gezeigt ist, können die experimentellen gemessenen Verteilungen durch etwa 4 verschiedene Diffusionskoeffizienten optimal beschrieben. Dabei handelt es sich nicht um eine Anpassung der experimentellen Ergebnisse, sondern lediglich um eine Illustration, die ein Modell für die Interpretation vorschlägt. Die Diffusionskonstanten von $0.5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ bzw. $2 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ markieren die untere bzw. obere Grenze der gemessenen Verteilung. Dazwischen ist noch mindestens eine weitere Komponente nötig, um die gemessene Verteilung wiederzugeben. Die experimentelle Genauigkeit der Spotgrößenanalyse ohne Mittelung ist nicht ausreichend, um die verschiedenen Diffusionskoeffizienten zu trennen. Damit kann die gemessene Verteilung von Diffusionskoeffizienten auch durch eine kontinuierliche Verteilung von Diffusionskoeffizienten interpretiert werden. Ebenso beobachtet man weder bei den 5-Punkt-gemittelten

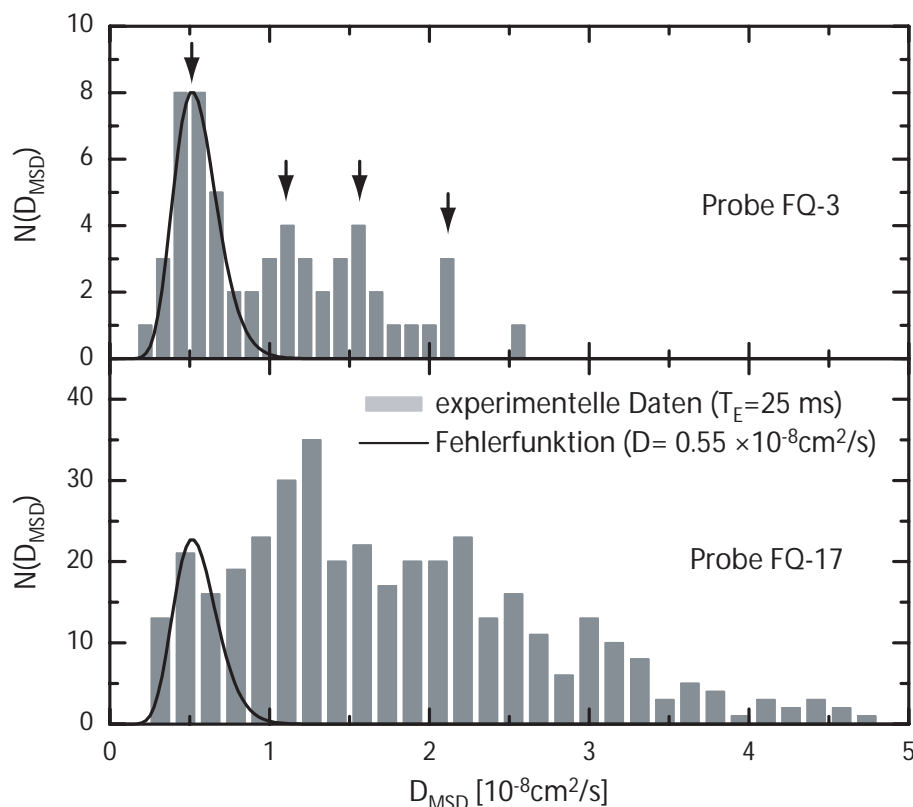


Abbildung 6.18: Ergebnisse der MSD-Analyse an den Proben FQ-3 und FQ-17 (Balken, Trajektorienlänge $L_T > 40$). Zusätzlich ist die Fehlerfunktion für einen Diffusionskoeffizienten von $D = 0.55 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2$ (durchgezogene Linie) angegeben. Die eingezeichneten Pfeile markieren die Positionen der einzelnen Peaks.

noch bei den trajektorien gemittelten Verteilungen der mittels Spotgrößenanalyse berechneten Diffusionskonstanten eine ausgeprägte und reproduzierbare Struktur der Verteilungen.

Die Verteilungsfunktion der an den Proben FQ-3 und FQ-17 aus der MSD-Analyse ermittelten Diffusionskonstanten für eine Trajektorienlänge von $L_T > 40$ (Abbildung 6.18) zeigen dagegen eine ausgeprägte Struktur. Die Ergebnisse an der Probe FQ-3 zeigen 4 Peaks, die eingezeichnete Fehlerfunktion macht deutlich, dass zumindest der erste Peak im Rahmen der experimentellen Genauigkeit eindeutig identifiziert werden kann. Die weiteren Peaks sind weniger ausgeprägt, aber deutlich zu erkennen. Am dickeren Film (Probe FQ-17) wird eine weniger ausgeprägte Struktur der Verteilungsfunktion beobachtet, obwohl die Statistik deutlich besser ist. Nur der erste Peak kann in der Verteilung identifiziert werden,

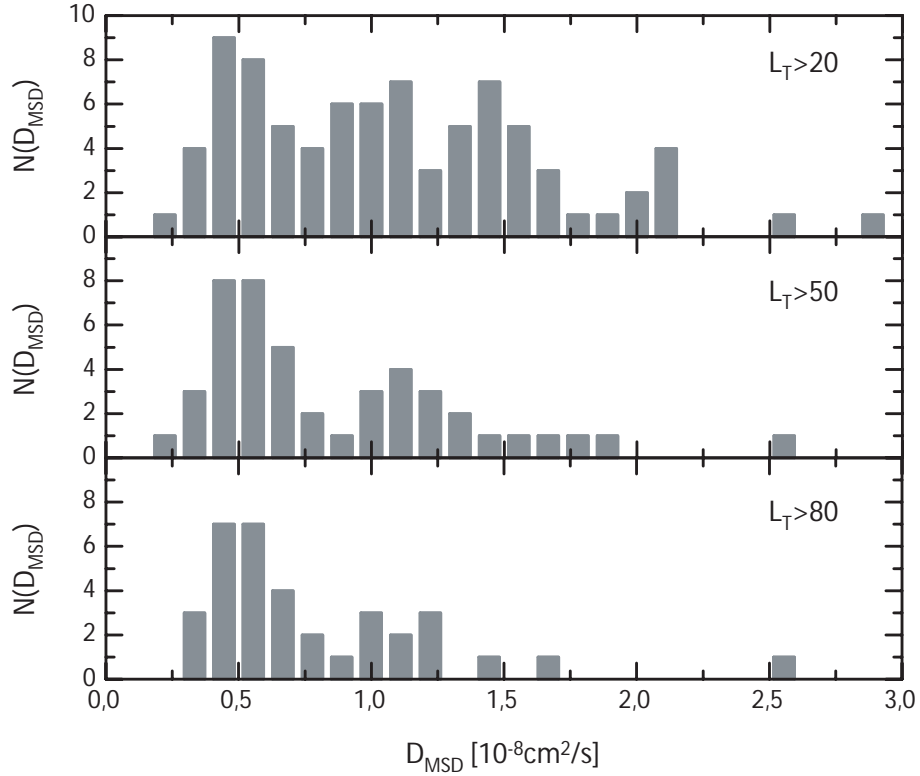


Abbildung 6.19: *Histogramme der mittels MSD-Analyse berechneten Diffusionskoeffizienten mit unterschiedlichen minimalen Trajektorienlängen für die Probe FQ-3.*

ein zweiter liegt zwischen den Positionen der Peaks 2 und 3 die am dünneren Film beobachtet wurden. Wiederum wird deutlich, dass im dickeren Film zusätzlich signifikant größere Werte der Diffusionskonstante beobachtet werden. Vor allem die Struktur der Verteilung der Diffusionskonstanten im dünneren Film deutet auf die Existenz von diskreten Werten der Diffusionskonstante hin.

Die Struktur der Verteilungen der aus der MSD-Analyse ermittelten Diffusionskoeffizienten zeigt sowohl für den dickeren als auch für den dünneren Film eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Trajektorienlänge, die in Abbildung 6.19 für die Probe FQ-3 wiedergegeben ist. Große Werte des Diffusionskoeffizienten werden fast ausschließlich für Trajektorien beobachtet, die aus weniger als 50 Einzelbeobachtungen bestehen, längere Trajektorien weisen kleinere Werte des Diffusionskoeffizienten auf. Die ersten beiden Peaks sind in allen Verteilungen sichtbar.

Nimmt man nun an, dass die unterschiedlichen Diffusionskonstanten der Diffu-

sion in unterschiedlichen Abständen von der Quarzoberfläche zugeordnet werden können und die oberflächennahe Diffusion mit kleineren Werten der Diffusionskonstante verbunden ist, weisen die in Abbildung 6.19 gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass sich die Moleküle länger in den oberflächennahen Bereichen aufhalten. Weiterhin kann aus der Struktur der Verteilungen gefolgert werden, dass Moleküle offenbar für relativ lange Zeiten in Bereichen der Flüssigkeit verbleiben, die durch einen festen Wert der Diffusionskonstante charakterisiert sind.

Schätzt man die Zeit ab, die Moleküle bei einer Diffusionskonstante von 10^{-8} cm^2/s benötigen, um diffusiv eine Strecke, die der Filmdicke (einige nm) entspricht, erhält man Werte, die deutlich unter einer Millisekunde (Größenordnung 10 μs bei 3 nm Filmdicke) liegen. Das bedeutet, dass normal diffundierende Moleküle selbst während der kürzesten Belichtungszeiten von 5 ms die gesamte Dicke des Flüssigkeitsfilms viele Male durchqueren. Selbst wenn eine Abhängigkeit der Diffusionskonstante vom Abstand der Oberfläche vorliegt, wäre es also unter diesen Bedingungen unmöglich, diese Abhängigkeit experimentell zu beobachten. Sollen die experimentellen Ergebnisse also durch eine Abstandsabhängigkeit der Diffusionskonstante erklärt werden, muss gleichzeitig von einer starken Einschränkung der Diffusion senkrecht zur Oberfläche, also einer ausgeprägten Anisotropie der Diffusionsprozesse ausgegangen werden.

Beobachtung von Sprüngen zwischen diskreten Werten der Diffusionskonstante

Die zuvor beschriebenen Überlegungen werden auch durch die Analyse von Zeitreihen der Spotgröße gestützt. Bei der Analyse der Spotgröße handelt es sich um eine experimentelle Methode, die von der Bestimmung des MSD unabhängig ist, die also komplementäre Informationen jeweils für die gleichen Trajektorien liefert.

Die Zeitreihen der Spotgröße lassen erkennen, dass einige Trajektorien über sehr lange Zeiten (bis hin zur Trajektorienlänge) weitgehend konstant hohe (Abb. 6.20, Molekül A1) oder niedrige (Abb. 6.20, Molekül A2) Werte der Spotgröße aufweisen. Die für die jeweiligen Trajektorien aus dem MSD berechneten Diffusionskoeffizienten unterscheiden sich ebenfalls deutlich und korrelieren gut mit den berechneten mittleren Spotgrößen. Ebenso beobachtet man Trajektorien mit abrupten Sprüngen der Spotgröße, die sich deutlich von statistischen Schwankungen der Spotgröße unterscheiden, wobei gelegentlich ausgedehnte Perioden

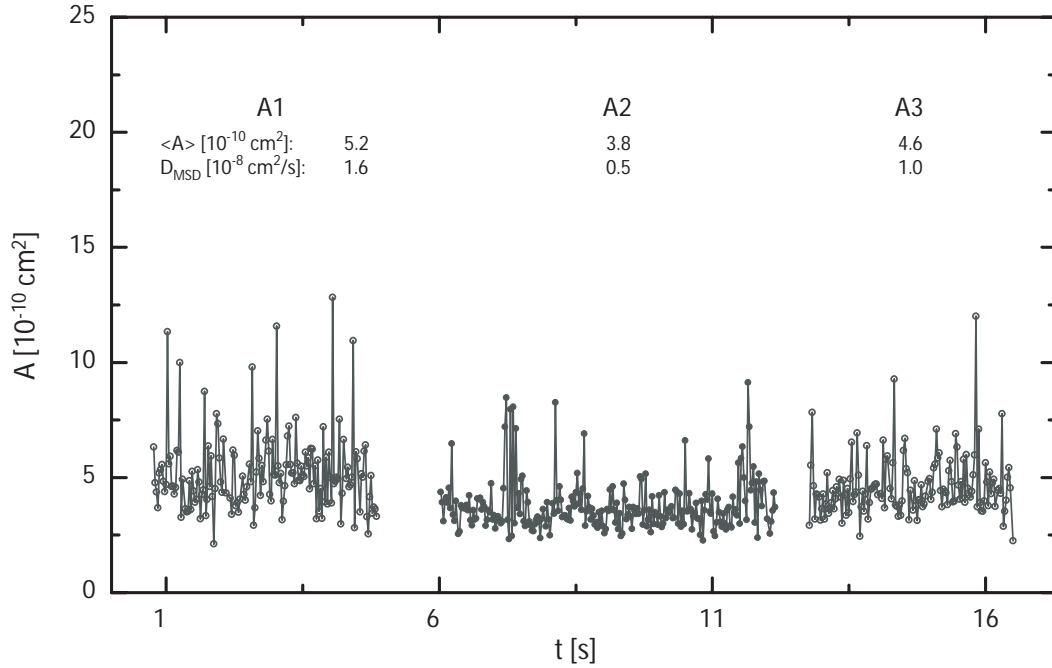


Abbildung 6.20: Zeitreihen der Spotgröße mit überwiegend konstanten Werten der Spotgröße (Probe FQ-3, $T_E = 25 \text{ ms}$).

mit konstant hoher oder niedriger Spotgröße zu beobachten sind (Abb. 6.21).

Beim Beobachten der Videosequenzen der diffundierenden Moleküle am Computermonitor wird deutlich, dass die Sprünge in der Spotgröße tatsächlich auch mit signifikanten Änderungen der Diffusionsgeschwindigkeiten der Moleküle verbunden sind. Durch die genaue Beobachtung der Videosequenzen kann auch ausgeschlossen werden, dass die Sprünge in der Spotgröße durch Fehler der Bildbearbeitungssoftware (etwa bei Kreuzung der Trajektorien zweier Moleküle) oder durch Instabilitäten im experimentellen Aufbau bedingt sind. Ebenso können für die in den Abbildungen 6.20, 6.21 und 6.22 gezeigten Trajektorien Attachments, die länger als die Belichtungszeit T_E dauern, ausgeschlossen werden.

Diese Beobachtungen können auch durch eine genauere Analyse unterlegt werden, die in Abbildung 6.22 exemplarisch für eine einzelne Trajektorie gezeigt ist. Dabei wurden Bereiche der Trajektorie, die signifikant unterschiedliche Werte der Spotgröße aufweisen, getrennt analysiert. Es ist zu erkennen, dass die Abschnitte 1, 2 und 3 deutlich verschiedene Spotgrößen aufweisen. Die Histogramme der Spotgrößen zeigen nur geringfügige Unterschiede zwischen den Abschnitten 1 und 3 aber deutliche Unterschiede zum Abschnitt 2. Der Verlauf des MSD

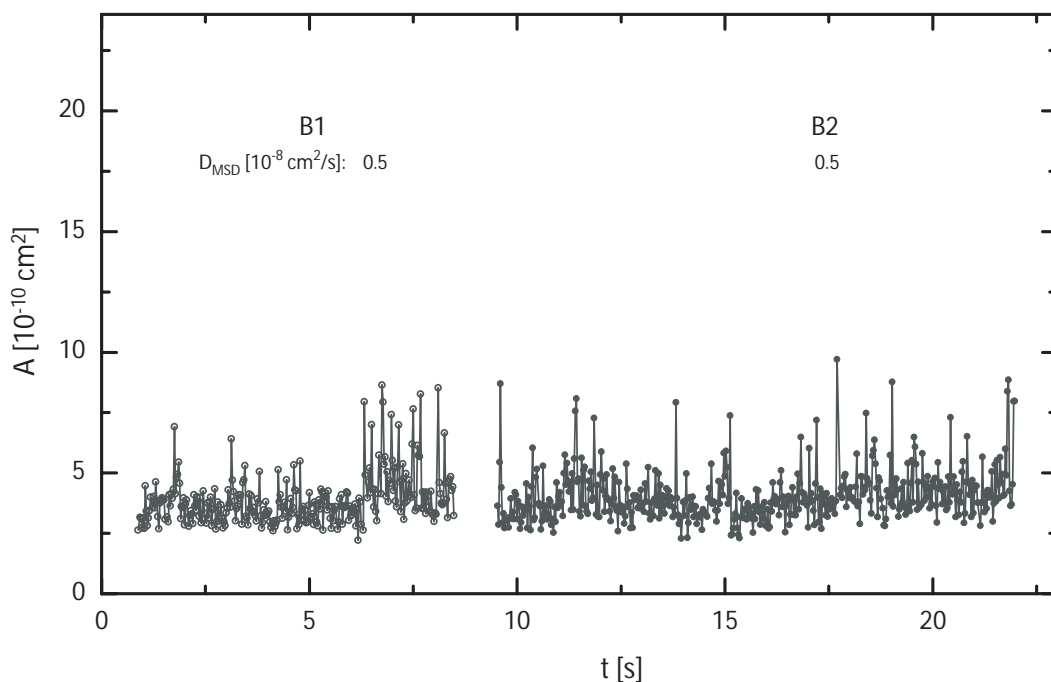


Abbildung 6.21: Zeitreihen der Spotgröße mit deutlichen Sprüngen in der Spotgröße (Probe FQ-3, $T_E = 25$ ms).

ist dagegen für alle drei Abschnitte deutlich verschieden. Betrachtet man die Abschnitte 2 und 3 der Trajektorie wird sowohl im MSD als auch in der mittleren Spotgröße deutlich, dass der Abschnitt 3 durch eine höhere Diffusionskonstante ($D_{MSD} = (1 \pm 0.2) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$) beschrieben wird, als der Abschnitt 2 ($D_{MSD} = (0.6 \pm 0.1) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$). Der Sprung in der Spotgröße zwischen den Abschnitten 2 und 3 ist also tatsächlich auch mit einem Sprung in der Diffusionskonstante um etwa einen Faktor zwei verbunden.

Eine zunächst widersprüchliche Situation ergibt sich dagegen für den Abschnitt 1. Während die Spotgröße auf eine schnelle Diffusion hinweist, verläuft das MSD sehr flach, deutet also auf eine stark verlangsamte Diffusion hin. Die Auflösung dieses scheinbaren Widerspruchs ergibt sich wiederum aus der genauen Beobachtung der entsprechenden Videosequenz. Diese zeigt deutlich eine sehr schnelle Bewegung des Moleküls, die aber auf einen sehr kleinen Bereich der Probe beschränkt ist. Eine solche eingeschränkte Diffusionsbewegung führt zu einem asymptotisch konstanten Wert des MSD nach einem zunächst linearen Anstieg [36], wie es hier auch beobachtet wird. Die Anwendung der in [36] beschriebenen Analyse eines solchen eingeschränkten Diffusionsprozesses liefert im

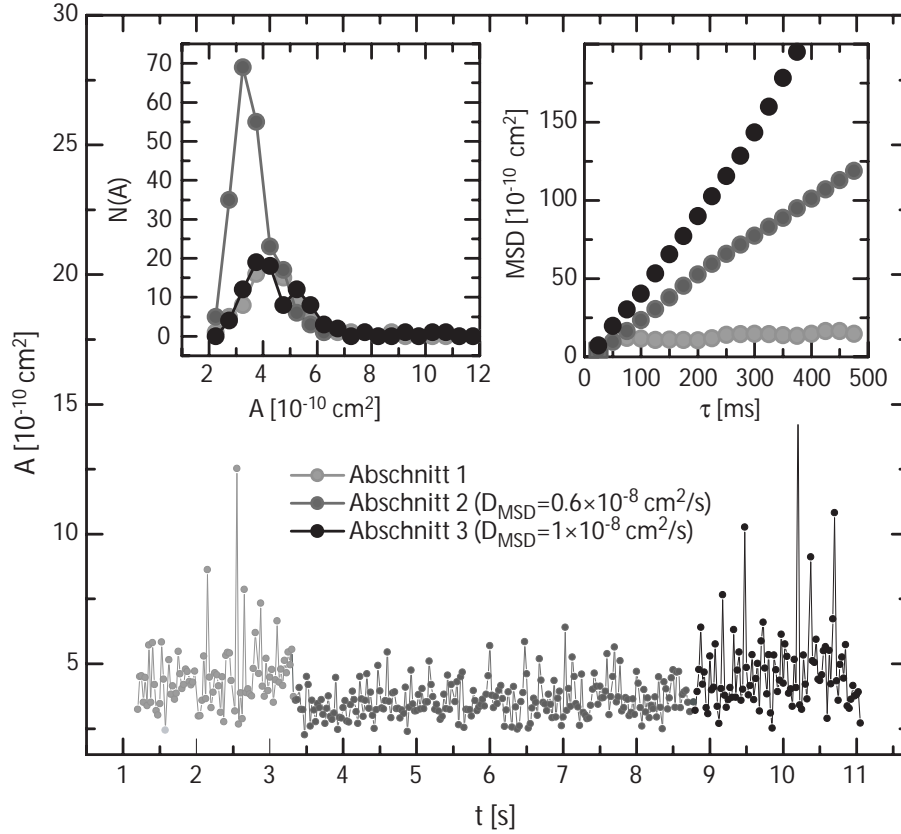


Abbildung 6.22: Analyse der Perioden unterschiedlicher Spotgröße in einer einzelnen Trajektorie (Probe FQ-3, $T_E = 25 \text{ ms}$). Dargestellt sind die Zeitreihe der Spotgröße (großes Bild), die Histogramme der Spotgrößen (kleines Bild, links) und das MSD für die einzelnen Perioden (kleines Bild, rechts).

hier beobachteten Beispiel eine charakteristische Abmessung von 600 nm für den Bereich, auf den die Diffusion beschränkt ist.

Dieses Beispiel zeigt, dass Diffusionsmodi existieren, in denen Spotgrößenanalyse und MSD-Analyse deutlich unterschiedliche Ergebnisse liefern. Dies ist z. B. dann der Fall, wenn ein Diffusionsprozess durch skalenabhängige Diffusionskonstanten beschrieben wird.

Bei der Untersuchung einer großen Zahl von Trajektorien zeigt sich, dass ca. 90 % der Trajektorien weitgehend konstante Werte der Spotgröße oder signifikante Fluktuationen der Spotgröße auf sehr kurzen Zeitskalen (einige 100 ms) aufweisen. Immerhin ca. 10 % der Trajektorien weisen aber über einige Sekunden ausgedehnte Perioden einer (im Rahmen der experimentellen Unsicherheit) konstanten Spotgröße, verbunden mit deutlichen Sprüngen in der Spotgröße auf.

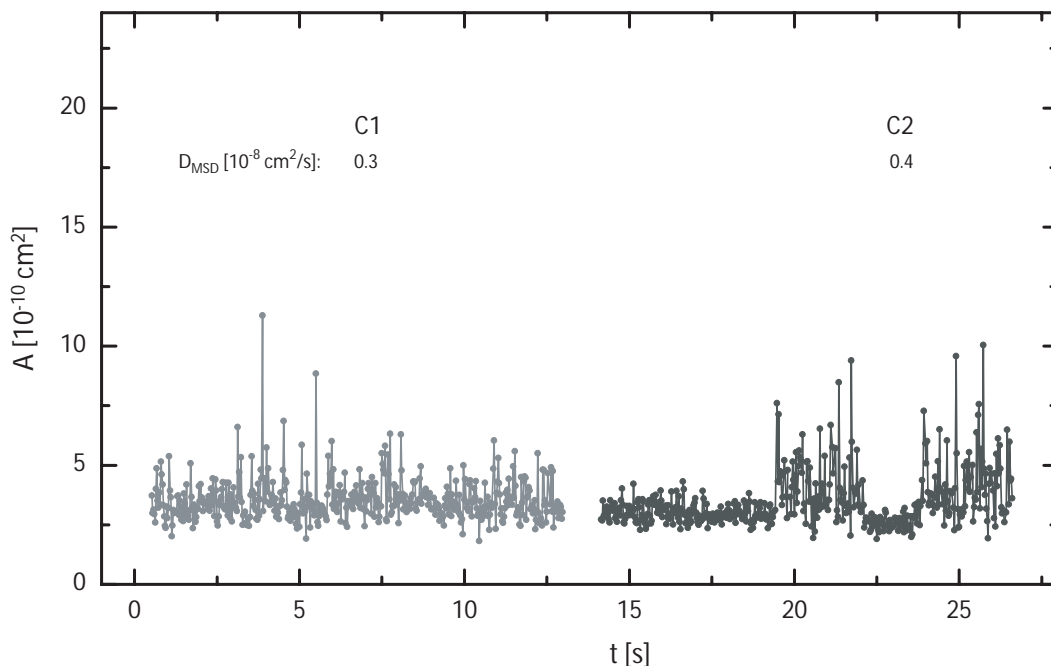


Abbildung 6.23: Zeitreihen der Spotgröße mit Attachments (Probe FQ-3, $T_E = 25 \text{ ms}$).

Nur ein geringer Teil davon wird durch Attachments verursacht.

In Abbildung 6.23 sind solche durch Attachments verursachten Perioden konstanter aber sehr niedriger Spotgröße dargestellt. Molekül C1 zeigt eine Trajektorie mit vielen kurzen Attachments, die immer wieder durch kurze Perioden der Diffusion unterbrochen werden. Die Trajektorie von Molekül C2 ist durch zwei, im Verlauf der Spotgröße deutlich zu erkennende, längere Attachments gekennzeichnet. Während der Attachments entspricht die Spotgröße dem Wert der durch das Beugungslimit gegeben ist ($3.2 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2$). Bereiche der Zeitreihen, in denen Attachments auftreten, sind auch durch wesentlich kleinere Schwankungen der Spotgröße gekennzeichnet.

Trajektorien mit sehr langen Bereichen konstanter Spotgröße beobachtet man nicht nur an dem ultradünnen Film FQ-3 sondern auch an den Proben FQ-17 und FSi-17 (Si/SiO₂). Bei dem Substrat der Probe FSi-17 handelt es sich um einen Silizium-Wafer auf dessen Oberfläche eine 100 nm dicke und hochreine SiO₂-Schicht gewachsen wurde. Die chemische Zusammensetzung der Oberfläche dieser Probe entspricht der der Quarzsubstrate.

Das hier beschriebene Diffusionsverhalten ist also offenbar charakteristisch für

die Diffusion von R6G in dünnen TEHOS-Filmen auf SiO₂-Oberflächen. Sowohl die ausgeprägten Strukturen in der Verteilung der Diffusionskonstanten als auch die beobachteten Sprünge in der Diffusionskonstante weisen auf die Existenz diskreter Werte der Diffusionskonstante, verbunden mit einer anisotropen Diffusion hin. Die charakteristischen Zeiten über die eine Diffusion mit konstanter Diffusionskonstante beobachtet wird, liegen im Bereich einiger 100 ms.

Die Tatsache, dass Strukturen in den Verteilungen der Diffusionskoeffizienten aus der Trajektorienanalyse (MSD), nicht aber in den 5-Punkt-gemittelten Ergebnissen der Spotgrößenanalyse beobachtet werden, weist zudem darauf hin, dass charakteristische Zeitskalen für Sprünge zwischen verschiedenen Werten der Diffusionskonstante zwischen dem 2.6 und 5-fachen der Belichtungszeit (65 bis 125 ms) liegen müssen⁴.

Vergleich mit Molekulardynamiksimulationen zum Liquid Layering

Von dünnen TEHOS-Filmen auf Oberflächen weiß man, dass durch die Anwesenheit der festen Oberfläche die Struktur der Flüssigkeit drastisch beeinflusst wird. In unmittelbarer Nähe der festen Oberfläche kommt es zur Ausbildung wohldefinierter Flüssigkeitsschichten (Liquid Layering, vgl. Abschnitt 2.1.2). Interpretiert man die hier beschriebenen experimentellen Ergebnisse als Resultat des Liquid Layering, entsprechen ausgedehnte Zeitintervalle, in denen die Moleküle mit konstanter Diffusionskonstante diffundieren, der Diffusion innerhalb einer solchen Flüssigkeitsschicht, sprungartige Veränderungen der Diffusionskonstante können durch Wechsel der Moleküle zwischen den Schichten erklärt werden.

Tatsächlich zeigen Molekulardynamik-Simulationen von dünnen TEHOS-Filmen auf einer Si-Oberfläche [15] sowohl die Ausbildung sehr ausgeprägter Flüssigkeitsschichten als auch ein Ansteigen der Diffusionskonstante mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche. Ebenso beobachtet man in diesen Simulationen, dass die Moleküle über sehr lang ausgedehnte Zeitintervalle vorzugsweise innerhalb einer Flüssigkeitsschicht diffundieren und sprungartig zwischen den Schichten wechseln (Abbildung 6.24).

Das Zeitfenster der Simulationen ist allerdings mit einer Gesamtdauer von bis zu 20 ns deutlich kleiner als alle experimentell zugänglichen Zeitskalen. Es ist

⁴Die Berechnung von Diffusionskonstanten aus dem MSD mittelt effektiv über Zeitabstände von $2.6 T_E$ entlang der Trajektorien.

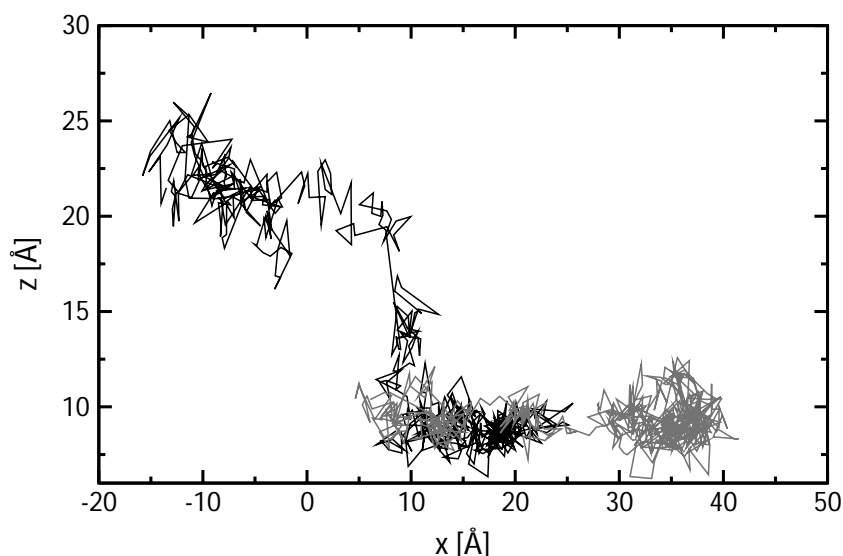


Abbildung 6.24: *Trajektorien von zwei Molekülen (grau und schwarz) in einer Molekulardynamik-Simulation von TEHOS auf einer Si-Oberfläche.*

deshalb zur Zeit noch nicht möglich, aus den Molekulardynamik-Simulationen zuverlässig die Frequenz zu bestimmen, mit der die Moleküle zwischen den Schichten wechseln.

Die in Abbildung 6.18 gezeigte Verteilung der aus dem MSD berechneten Diffusionskonstanten an der Probe FQ-3 lässt sich durch vier Diffusionskonstanten beschreiben (0.55 , 1.2 , 1.6 und $2.1 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$). Ordnet man diese Diffusionskonstanten testweise verschiedenen TEHOS-Schichten im Abstand z (1 , 2 , 3 und 4 nm) von der Oberfläche zu, so ergibt sich eine erstaunlich gute Übereinstimmung mit Simulationsdaten (Abbildung 6.25) [15]. Denkbar wäre auch, dass sich die R6G-Moleküle zwischen den TEHOS-Schichten aufhalten. Da der Abstand der Farbstoffmoleküle von der Oberfläche aber experimentell nicht zugänglich ist, kann auch die Position der R6G-Moleküle relativ zu den TEHOS-Schichten nicht bestimmt werden. Die Position der TEHOS-Schichten ist jedoch aus Molekulardynamiksimulationen [15] und Röntgenbeugungsexperimenten [11] mit hoher Genauigkeit bekannt (im Fall eines ca. 5 nm dicken Films liegen die Schichten bei 0.9 , 2.1 , 3.3 und 4.5 nm).

In Abbildung 6.25 ist ebenfalls zu erkennen, dass die unterste Schicht sehr deutlich ausgeprägt ist während die weiteren Schichten weniger deutlich ausgeprägt sind. Die Schichten können aber in der Häufigkeitsverteilung der Abstände

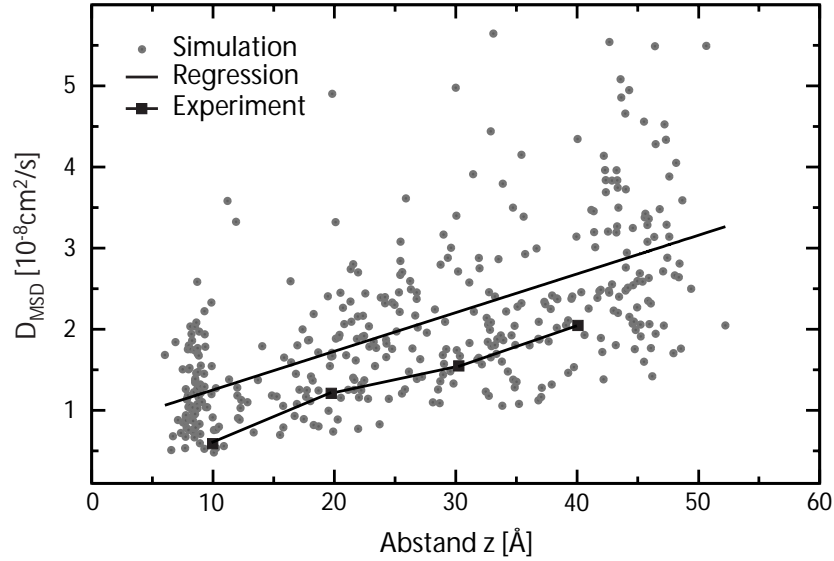


Abbildung 6.25: Aus den Molekulardynamik-Simulationen eines ca. 5 nm dicken TEHOS-Films auf Si ermittelte Diffusionskonstanten in Abhängigkeit vom Abstand z der Moleküle von der Si-Oberfläche [15]. Die durchgezogene Linie ist eine lineare Regression der Simulationsergebnisse, die schwarzen Quadrate zeigen experimentelle Daten.

der Moleküle von der Oberfläche eindeutig identifiziert werden [15].

Sehr anschaulich kann die Bewegung der Moleküle in den verschiedenen Flüssigkeitsschichten anhand des Potentials diskutiert werden, in dem sich die Moleküle bewegen. Abbildung 6.26 zeigt den Verlauf des Potentials, das aus den Daten der Molekulardynamiksimulation eines ca. 5 nm dicken TEHOS-Films berechnet wurde [15]. Die Absolutwerte des Potentials stellen lediglich eine untere Abschätzung der Potentialtiefen dar, die Abstandsabhängigkeit des Potentialverlaufs kann dagegen mit hoher Sicherheit bestimmt werden [15]. Die Positionen der Potentialminima entsprechen dem Schwerpunkt der einzelnen Schichten. Das erste Minimum ist am deutlichsten ausgeprägt und weist die größte Tiefe auf. Dies entspricht der Beobachtung, dass die oberflächennächste Schicht sehr stark ausgeprägt ist, die weiteren Schichten weniger deutlich ausgeprägt sind (vgl. Abb. 6.25).

Ein Molekül, das sich in der 1. Schicht bewegt, benötigt also eine höhere Energie, um in die zweite Schicht zu gelangen, als für den Wechsel zwischen den anderen Schichten nötig ist. Damit kann die experimentelle Beobachtung erklärt werden, dass sich Moleküle relativ lange in der oberflächennahen Schicht aufhal-

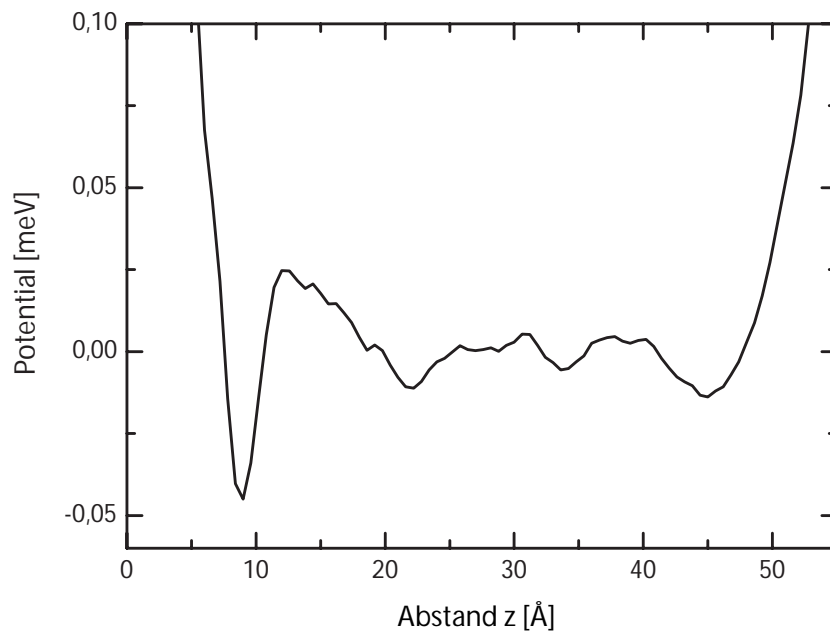


Abbildung 6.26: Aus Molekuldynamiksimulationen eines ca. 5 nm dicken TEHOS-Films auf Si berechnetes Potential in Abhängigkeit vom Abstand z von der Oberfläche [15].

ten (also der Schicht mit dem niedrigsten Diffusionskoeffizienten) und sich nur für deutlich kürzere Intervalle in den oberflächenfernen Schichten bewegen. Um die experimentellen Beobachtungen zu ermöglichen muss die mittlere Aufenthaltszeit innerhalb einer Schicht auf jeden Fall größer sein als die Belichtungszeit, die die kleinste experimentell auflösbare Zeitskala darstellt. Beschreibt man den Wechsel zwischen den Schichten wiederum als aktivierten Prozess, ergeben sich bei maximalen Zeitskalen von einigen 100 ms maximale Potentialtiefen von 700 meV. Die experimentellen Ergebnisse weisen also darauf hin, dass die Potentialbarrieren im TEHOS-Film deutlich größer als die aus den Molekuldynamiksimulationen berechneten Potentialbarrieren sind.

Für den dickeren Film (Probe FQ-17) wurde eine weniger ausgeprägte Struktur der Verteilung der Diffusionskonstanten beobachtet. Im Bild des Liquid Layering würde das bedeuten, dass auch die Schichtstruktur in einem dicken Flüssigkeitsfilm weniger stark ausgeprägt ist. Es ist offensichtlich, dass mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche auch in zunehmendem Maße die Flüssigkeitsstruktur in die der Bulk-Flüssigkeit übergeht. Die Gegenwart ungeordneter, oberflächenferner Bereiche des Flüssigkeitsfilm führt aber andererseits auch wie-

der zu einer Verringerung der oberflächennahen Ordnung.

Extrapoliert man den linearen Anstieg der Diffusionskonstante (Abb. 6.25) zu höheren Abständen, findet man, dass erst für sehr große Abstände (ca. 70 nm) der Wert der Diffusionskonstante im Bulkmaterial ($3.7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) erreicht wird. Der Anstieg der Diffusionskonstante beträgt dabei $0.5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. Die im dickeren Film (Probe FQ-17) beobachtete maximale Diffusionskonstante von $1.2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ und die im Precursorfilm (Dicke 1 nm) ermittelte mittlere Diffusionskonstante von $0.5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ passen ebenfalls sehr gut in das Bild eines linearen Anstiegs des Diffusionskoeffizienten.

Mit der Diffusion der Moleküle in unterschiedlichen Schichten mit unterschiedlichen Diffusionskonstanten und ausgeprägt anisotropem Diffusionsverhalten kann auch erklärt werden, dass bei vielen Trajektorien mit der Spotgrößenanalyse ein bis zu einem Faktor 2 größerer Diffusionskoeffizient gemessen wird, als mit der Trajektorienanalyse. Nimmt man an, dass die Moleküle sich häufig für kurze Zeit in der obersten Schicht mit dem größten Diffusionskoeffizienten aufhalten, aber die meiste Zeit in Schichten mit relativ niedrigen Diffusionskoeffizienten diffundieren, so können diese kurzen Ausflüge den Wert der mittleren Spotgröße deutlich erhöhen, während sie sich im MSD kaum niederschlagen, was letztlich durch Unterschiede in der Mittelung bei der Berechnung der Diffusionskonstanten durch beide Methoden begründet ist. Damit kann auch erklärt werden, dass dieser Effekt in der dickeren Schicht der Probe FQ-17 deutlich ausgeprägter ist, als bei der Probe FQ-3.

Unter der Annahme des Liquid Layerings können Attachments nur stattfinden, wenn sich die Moleküle in der oberflächennächsten Schicht befinden. Da sich der Abstand der Moleküle von der Oberfläche im Experiment aber nicht bestimmen lässt, ist es schwer, Aussagen darüber zu treffen, ob dies tatsächlich der Fall ist. Ebenso ist es kaum möglich, sichere Aussagen über die Natur der Attachment-Prozesse machen. Neben möglichen Bindungen an Verunreinigungen der Oberfläche wäre auch denkbar, dass zumindest in einigen Bereichen der Probe auch nahezu gefrorene Flüssigkeitsschichten existieren, in denen die Bewegung der Moleküle soweit verlangsamt ist, dass ihre Position auf den experimentell zugänglichen Zeitskalen unverändert bleibt. Dies könnte zum Beispiel in Bereichen der Probe der Fall sein, in denen die Oberfläche auf atomarer Skala extrem glatt ist.

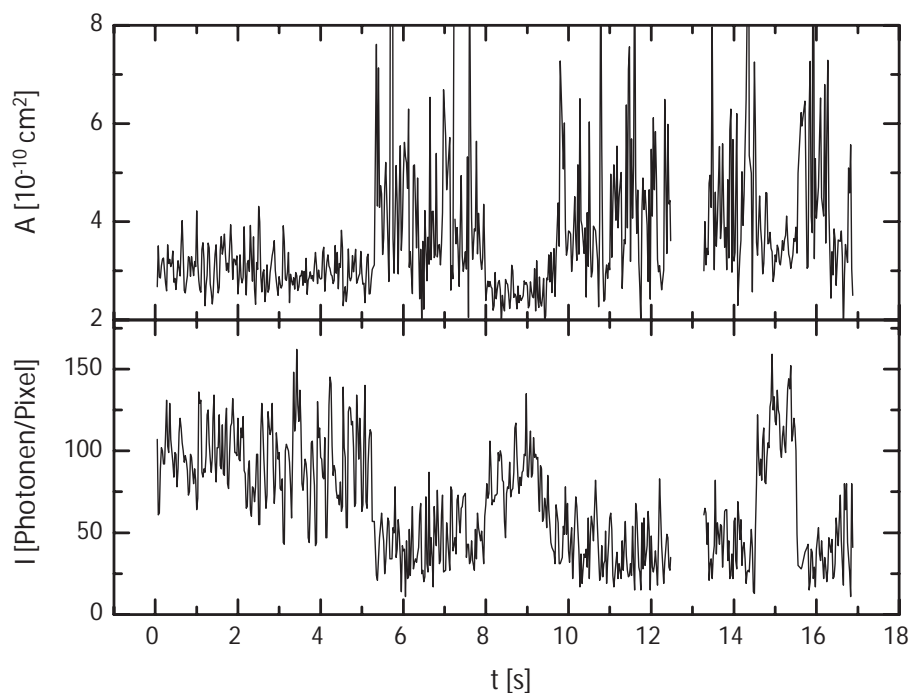


Abbildung 6.27: Zeitreihen der Intensität und der Spotgröße (Probe FQ-3, $T_E = 25$ ms, Anregungsleistung 12 mW).

Insgesamt lassen sich also die experimentellen Ergebnisse im Bild des Liquid Layering sehr gut beschreiben. Die experimentellen Ergebnisse befinden sich auch in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Molekulardynamik-Simulationen [15].

Weitere experimentelle Ergebnisse

Abschließend sollen nun noch einige experimentelle Ergebnisse vorgestellt werden, die die bisher gewonnen Informationen ergänzen.

Neben der Spotgröße A ist die Spothöhe, also die Peakintensität I_0 (vgl. Gleichung 4.7) eine weitere Meßgröße zur Charakterisierung der auf der CCD-Kamera detektierten Fluoreszenzspots. Im Falle diffusionsverbreiterter Spots ist offensichtlich, dass die Größen A und I_0 nicht unabhängig voneinander sind. Unter der Annahme, dass die Moleküle pro Zeiteinheit stets eine konstante Zahl von Photonen emittieren, ist zu erwarten, dass schnell diffundierende Moleküle (hohe Spotgröße) eine sehr niedrige Peakintensität aufweisen, für sehr langsam diffundierende (beugungslimitierte Spotgröße) Moleküle ist dagegen zu erwarten, dass

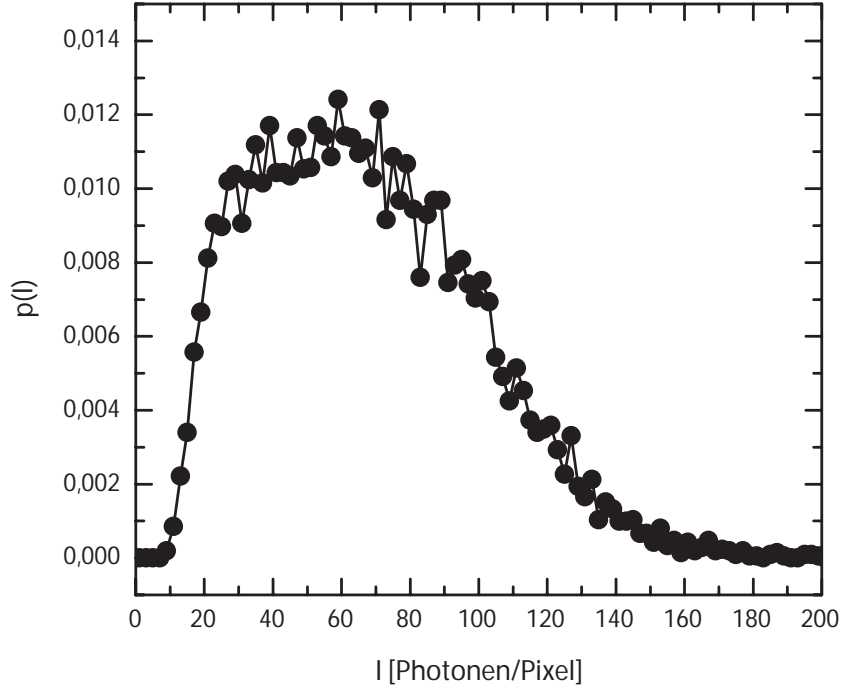


Abbildung 6.28: Verteilung der Spitzenintensität der Spots (Probe FQ-3, $T_E = 25$ ms, Anregungsleistung 12 mW).

die Peakintensität den Maximalwert annimmt.

Die in Abbildung 6.27 simultan dargestellten Zeitreihen der Peakintensität und der Spotgröße belegen diesen Zusammenhang, hohe Werte der Peakintensität erscheinen bei geringen Spotgrößen, niedrige Werte der Peakintensität sind mit hohen Spotgrößen verbunden. Dies wird wiederum besonders deutlich während der Attachment-Perioden, bei denen die Spotgröße den Wert des Beugungslimits erreicht.

Entsprechend der Breite der Verteilung der Spotgrößen zeigen auch die Peakintensitäten eine sehr breite Verteilung. In Abbildung 6.28 ist die Verteilung der Peakintensitäten für einige 1000 Einzelbeobachtungen von Spots diffundierender Moleküle wiedergegeben. Die Breite dieser Verteilung enthält ebenfalls Informationen über Diffusionsprozesse, die aber nicht weiter analysiert wurden, da die Peakintensität auch durch andere Prozesse (Photophysik, Rotation der Moleküle) beeinflusst wird.

An der Probe FSi-17 (Silizium mit einer 100 nm dicken Siliziumdioxid-Schicht) wurden zusätzlich Experimente zur polarisationsaufgelösten Fluoreszenzdetekti-

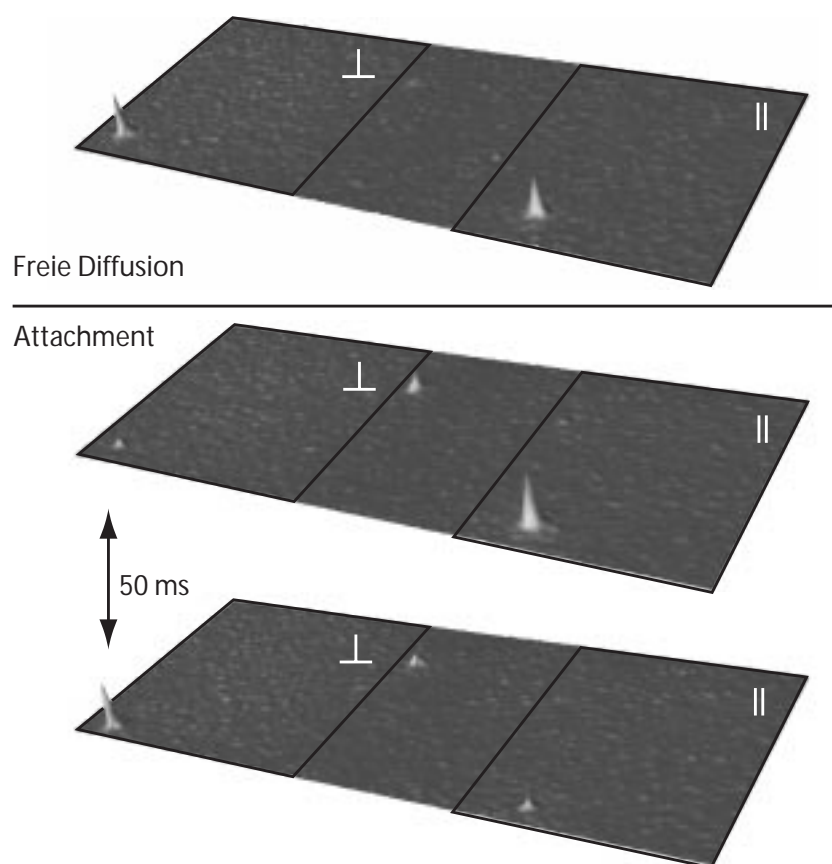


Abbildung 6.29: *Polarisationsaufgelöste Abbildung eines diffundierenden (oben) und eines immobilen Moleküls (Attachment, mittleres und unteres Bild). Die schwarzen Linien geben die Grenzen der korrespondierenden Bildbereiche an (jeweils orthogonale Polarisationskomponenten).*

on durchgeführt. Diese Experimente zeigen, dass die diffundierenden Moleküle sehr schnell rotieren und damit in beiden Kanälen mit gleicher Helligkeit erscheinen. Während der Attachment-Perioden weisen die meisten Moleküle unterschiedliche Intensitäten in beiden Kanälen auf, wobei sich das Verhältnis der Amplituden I_{\perp} und I_{\parallel} über mehrere Bilder (Zeitskalen von 50 bis zu einigen 100 ms) ändert, was auf eine relativ langsame Rotationsdiffusion einiger Moleküle während der Attachment-Perioden hinweist (Abbildung 6.29).

Das Auftreten von räumlichen Heterogenitäten der Probe wäre ein weiterer Ansatz, unterschiedliche Diffusionskonstanten der einzelnen Moleküle zu erklären. Tatsächlich gibt es aber keine systematischen experimentellen Hinweise auf eine solche Situation. Vielmehr beobachtet man schnell und langsam diffundierende

Moleküle in den gleichen Bereichen der Probe.

Berechnet man über viele Trajektorien für jeden Punkt der Probe den Mittelwert der Spotgröße, zeigen sich keine Bereiche mit ausgeprägt hohen oder niedrigen Werten der mittleren Spotgröße. Weiterhin wird dabei sichtbar, dass die Trajektorien flächenfüllend sind, also alle Bereiche der Probe im Rahmen der erreichbaren statistischen Genauigkeit mit gleicher Häufigkeit besucht werden. Ebenso sind keine Bereiche der Probe festzustellen, in denen Attachments häufiger auftreten, als in anderen Bereichen.

Es bleibt anzumerken, dass die hier vorgestellten experimentellen Ergebnisse nur einen Teil der Daten widerspiegeln, die an den dünnen Flüssigkeitsfilmen gewonnenen wurden. Insgesamt wurden mehr als 1000 Videosequenzen aufgezeichnet, aus denen durch die Bildverarbeitungssoftware weit mehr als 5000 Trajektorien extrahiert wurden. Im Rahmen der automatisierten Datenauswertung wurden ca. 90 % der Trajektorien analysiert. Eine Überprüfung der Ergebnisse der automatischen Datenanalyse durch Vergleich mit den Videosequenzen wurde für die etwa 300 längsten Trajektorien durchgeführt. Nur durch eine solche, sehr aufwändige, Datenanalyse von Hand ist es aber möglich, Phänomene wie Sprünge in der Spotgröße oder eingeschränkte Diffusion zu erkennen.

6.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die an Farbstoffmolekülen in ultradünnen TEHOS-Filmen auf Quarzoberflächen gemessenen Diffusionskonstanten zeigen eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Dicke der Filme. Die jeweils maximalen Werte und die Ensemblemittelwerte der Diffusionskonstanten nehmen mit zunehmender Filmdicke zu. Die beobachteten Minimalwerte der Diffusionskonstante zeigen jedoch keine ausgeprägte Abhängigkeit von der Filmdicke.

Die an einem ca. 3 nm dicken TEHOS-Film gemessenen Verteilungen der Diffusionskonstanten zeigen eine ausgeprägte Struktur, die auf die Existenz von bis zu vier diskreten Werten der Diffusionskonstante hinweist. Weiterhin werden in den TEHOS-Filmen ausgedehnte Perioden (bis zu einigen 100 ms) konstanter Diffusionskonstante und Sprünge zwischen verschiedenen Werten der Diffusionskonstante beobachtet.

Die experimentellen Ergebnisse können als Resultat des Liquid Layering interpretiert werden. Perioden konstanter Diffusionskonstante entsprechen dann der Diffusion innerhalb einer Flüssigkeitsschicht, die Sprünge in der Diffusionskonstante entsprechen Sprüngen zwischen den Flüssigkeitsschichten. Der Vergleich mit Molekulardynamiksimulationen dünner TEHOS-Filme stützt diese Interpretation und erlaubt es, die diskreten Werte der Diffusionskoeffizienten dem Abstand der Moleküle von der Oberfläche zuzuordnen. Damit ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Diffusionskonstante vom Abstand der Farbstoffmoleküle zur Quarzoberfläche, die durch einen Anstieg von $0.5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ charakterisiert wird. Die Höhe der Potentialbarriere zwischen den einzelnen Schichten kann auf einen Wert von maximal 700 meV abgeschätzt werden.

In den Experimenten wird die Diffusion des Farbstoffs Rhodamin 6G in dünnen TEHOS-Filmen untersucht. Damit können zunächst keine Aussagen über die Mobilität der TEHOS-Moleküle gemacht werden. Die gute Übereinstimmung mit Molekulardynamiksimulationen von in vergleichbaren Filmen diffundierenden TEHOS-Molekülen weist aber darauf hin, dass sich die Mobilität von TEHOS und R6G nicht gravierend unterscheidet. Selbst wenn man berücksichtigt, dass nur die Diffusion der Farbstoffmoleküle beobachtet wird, kann auf Grund der hohen Verdünnung davon ausgegangen werden, dass sich die Farbstoffmoleküle in einer Struktur bewegen, die ausschließlich aus TEHOS-Molekülen gebildet wird und dass damit das Verhalten der Farbstoffe Rückschlüsse auf die Struktur der

TEHOS-Filme zulässt.

Weiterhin wird beobachtet, dass die Diffusion der Moleküle immer wieder von kurzen Perioden unterbrochen wird, in denen sich die Position der Moleküle nicht ändert (Attachments). Letztlich können keine Aussagen über die Natur dieser Attachments gemacht werden. Mögliche Erklärungen sind sowohl Bindungen an die Oberfläche (mit einer Bindungsenergie von ca. 0.7 eV) als auch die Existenz von Bereichen der Flüssigkeit mit stark herabgesetzter Mobilität (gefrorene Flüssigkeitsschichten).

Es konnte gezeigt werden, dass die Spotgrößenanalyse eine unabhängige Methode zur Bestimmung von Diffusionskonstanten diffundierender Moleküle ist. Die Spotgrößenanalyse bietet die Möglichkeiten, Veränderungen der Diffusionskonstante instantan zu detektieren. Für die hier beobachteten komplexen und stark anisotropen Diffusionsprozesse (Wechsel zwischen verschiedenen Flüssigkeitsschichten mit unterschiedlicher Mobilität der Moleküle) stimmen die Ergebnisse der Spotgrößenanalyse und Trajektorienanalyse nur näherungsweise überein, es ergeben sich systematische Unterschiede.

An allen hier untersuchten Proben wird eine Verlangsamung der Diffusion in Oberflächennähe verglichen mit der Diffusion in der Bulk-Flüssigkeit festgestellt. Ergebnisse der Benetzungsforschung [16, 20] weisen jedoch darauf hin, dass die Precursorfilme in der Umgebung eines benetzenden TEHOS-Tropfens diffusiv mit einer Diffusionskonstante, die über dem Wert der Diffusion in der Bulk-Flüssigkeit liegt, wachsen. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dagegen, dass es sich dabei tatsächlich um einen diffusiven Transportmechanismus handelt. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Diffusion auch in den Precursorfilmen signifikant gegenüber der Bulk-Flüssigkeit verlangsamt ist und das Wachstum des Precursorlayers über andere Transportmechanismen vermittelt wird. Denkbar wäre z.B. eine sehr schnelle Diffusion von Molekülen in einer Schicht mit Submonolagenbedeckung über dem Precursorfilm, der aus molekularen Monoschichten besteht. Ein effektives Wachstum des Precursorfilms könnte auch durch eine zusätzliche radiale Drift der Moleküle erfolgen. Für beide Mechanismen liegen aber keine experimentellen Hinweise vor.

Die Veröffentlichung der experimentellen Ergebnisse ist in Vorbereitung [132, 133].

Kapitel 7

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Diffusion in dünnen Flüssigkeitsfilmen mit Methoden der Einzelmoleküldetektion untersucht. Es werden sowohl Experimente an dünnen Filmen am Rand benetzender Tropfen als auch an ausgedehnten dünnen Flüssigkeitsfilmen durchgeführt. Einzelne Moleküle der Farbstoffe Rhodamin 6G und Oregon Green 514 werden dabei als Sonden benutzt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ein Konfokalmikroskop und ein Videomikroskop entwickelt und aufgebaut. Diese experimentellen Aufbauten sind für die Detektion der Fluoreszenz einzelner Moleküle in dünnen Flüssigkeitsfilmen optimiert. Zusätzlich wurden Methoden und Software zur automatischen Analyse von videomikroskopischen Aufnahmen diffundierender Moleküle entwickelt.

Anhand umfangreicher Computersimulationen wird die Spotgrößenanalyse als neue Methode zur Bestimmung von Diffusionskonstanten aus videomikroskopischen Aufnahmen diffundierender Moleküle vorgestellt. Die Spotgrößenanalyse basiert auf der Analyse der Verbreiterung der Abbilder einzelner Moleküle in videomikroskopischen Aufnahmen, die durch die Diffusion der Moleküle während der Belichtung der CCD-Kamera hervorgerufen wird. Es wird gezeigt, dass die Spotgrößenanalyse gegenüber der Berechnung der Diffusionskonstante aus der mittleren quadratischen Verschiebung den Vorteil einer höheren Genauigkeit und die Möglichkeit der instantanen Detektion von Veränderungen der Diffusionskonstante aufweist.

Es konnte gezeigt werden, dass es mittels konfokaler Mikroskopie und der Technik der Fluoreszenzburstanalyse möglich ist, die Diffusionskoeffizienten von Farbstoffmolekülen in verschiedenen Flüssigkeiten zu bestimmen. An partiell be-

netzenden Ethylenglykoltropfen wurde eine signifikante Verlangsamung der Diffusion der Farbstoffmoleküle im Randbereich der Tropfen beobachtet.

Mittels Einzelmolekülvideomikroskopie wurden Diffusionsprozesse in ultradünnen Filmen aus TEHOS (Tetrakis(2-ethyl-hexoxy)-silan) und PDMS (Polydimethylsiloxan) auf Quarzoberflächen untersucht. Die untersuchten Flüssigkeitsfilme weisen eine Dicke von 1 bis 17 nm auf. Dabei wurde erstmals die Spotgrößenanalyse zur Auswertung experimenteller Ergebnisse genutzt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Diffusion in diesen ultradünnen Flüssigkeitsfilmen stark anisotrop ist. Die beobachteten Diffusionsprozesse lassen sich durch die Ausbildung von Flüssigkeitsschichten, zwischen denen der Austausch stark eingeschränkt ist (Liquid Layering [11,13]), erklären. Die laterale Diffusion ist gegenüber der Bulk-Flüssigkeit um mehr als eine Größenordnung verlangsamt. Die vertikale Komponente der Diffusion ist nahezu vollständig eingefroren, eine vertikale Bewegung der Moleküle kann nur durch Sprünge zwischen verschiedenen Flüssigkeitsschichten erfolgen. Weiterhin wird eine lineare Abhängigkeit der Diffusionskonstante der Farbstoffmoleküle vom Abstand zur Quarzoberfläche beobachtet. Diese Ergebnisse befinden sich in guter Übereinstimmung mit Molekulardynamiksimulationen von TEHOS-Filmen auf Silizium-Oberflächen [15] und anderen experimentellen Ergebnissen zum Liquid Layering an TEHOS [11, 13].

In dünnen TEHOS- und PDMS-Filmen wird beobachtet, dass die Diffusion der Moleküle immer wieder von kurzen Perioden unterbrochen wird, in denen sich die Position der Moleküle nicht ändert (Attachments). Die experimentellen Ergebnisse erlauben aber keine Aussagen über die Ursachen dieser Attachment-Perioden.

Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, mit Einzelmoleküluntersuchungen Informationen über die Struktur ultradünner Flüssigkeitsfilme zu erhalten. Einzelne Farbstoffmoleküle erweisen sich dabei als Sonden, die geeignet sind, die Struktur ihrer Umgebung abzutasten ohne selbst diese Struktur wesentlich zu verändern.

Kapitel 8

Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode der Spotgrößenanalyse ermöglicht völlig neuartige experimentelle Ansätze zur Bestimmung der Mobilität fluoreszierender Sonden. Kombiniert mit modernen Techniken der Bildverarbeitung ist es möglich, Diffusionskonstanten aus der einmaligen Abbildung mehrerer diffundierender Moleküle auf eine CCD-Kamera zu bestimmen. Damit ist es möglich, in experimentellen Aufbauten zur Bestimmung von Diffusionskonstanten diffundierender Moleküle auch sehr einfache CCD-Kameras einzusetzen, die nur eine geringe Bildfrequenz aufweisen, womit diese experimentelle Technik auch einem wesentlich breiteren Kreis von Nutzern zur Verfügung gestellt werden kann. Diese neuen Möglichkeiten sollten in weiteren Experimenten demonstriert werden.

Für Moleküle die in ultradünnen Flüssigkeitsfilmen diffundieren, liefern Spotgrößenanalyse und die Analyse der Trajektorien durch Berechnung der mittleren quadratischen Verschiebung zwar vergleichbare aber systematisch unterschiedliche Ergebnisse. Deshalb ist hier eine weitere Modellbildung und die Durchführung von Computersimulationen unumgänglich, um den Einfluss der stark anisotropen Diffusionsprozesse auf beide Analysemethoden zu untersuchen.

Die hier vorgestellten experimentellen Ergebnisse konnten zeigen, dass es in ultradünnen Flüssigkeitsfilmen zur Ausbildung von Flüssigkeitsschichten kommt, zwischen denen der Austausch stark eingeschränkt ist. Hier könnten temperaturabhängige Messungen weitere Informationen über die Austauschraten und die damit verbundenen Potentialbarrieren liefern. Eine Absenkung der Proben temperatur sollte zudem zu einer deutlich stärkeren Ausprägung der Flüssigkeitsschichten führen, so dass Sprünge zwischen den Schichten zuverlässiger detektiert

werden können. Wesentliche Verbesserungen bei der Analyse der experimentellen Ergebnisse würde auch eine möglichst simultane Bestimmung der Dicke der Flüssigkeitsfilme mit höchster Genauigkeit, etwa durch Ellipsometrie bringen.

Von grundsätzlichem Interesse sind Untersuchungen zum Liquid Layering an weiteren Flüssigkeiten und Oberflächen. Momentan ist nicht bekannt, unter welchen Bedingungen es zur Ausbildung von Flüssigkeitsschichten in Oberflächennähe kommt. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass eine sehr große Zahl von Flüssigkeiten dieses Phänomen zeigt. Eine wichtige Rolle spielt dabei sicherlich die Rauigkeit der Oberflächen, auf denen die Flüssigkeitsfilme präpariert werden. Keinerlei Erkenntnisse liegen derzeit darüber vor, ob es auch auf weichen Oberflächen (z. B. Lipidmembranen) zur Ausbildung von Flüssigkeitsschichten kommt.

Die in diesem Zusammenhang vielleicht interessanteste Frage ist, ob sich auch die Struktur von Wasser in der Nähe von Oberflächen ändert. Dies hätte unmittelbare Relevanz für viele biologische Fragestellungen. Untersuchungen an ultradünnen Wasserfilmen könnten mit den in der vorliegenden Arbeiten beschriebenen experimentellen Methoden durchgeführt werden. In einer Zelle mit konstanter und justierbarer Luftfeuchtigkeit kann die Dicke eines Wasserfilms auf einem hydrophilen Substrat zuverlässig kontrolliert werden. Die geringe Viskosität und die damit verbundenen hohen Diffusionskonstanten von in Wasser gelösten Molekülen stellen allerdings hohe experimentelle Anforderungen an die Detektion der diffundierenden Moleküle.

Schließlich wäre es auch von großem Interesse, Experimente an Molekülen durchzuführen, an die ein Farbstoff kovalent gebunden ist und die sich nicht wesentlich von gleichartigen Molekülen ohne Farbstoff unterscheiden. Damit könnte sicher gestellt werden, dass tatsächlich die Diffusion der zu untersuchenden Spezies und nicht die des Farbstoffes beobachtet wird. Möglich ist eine solche Fluoreszenzmarkierung, die die Eigenschaften der Moleküle nicht wesentlich ändern soll, sicherlich nur bei größeren Molekülen.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Youngs Konstruktion zur Berechnung des Gleichgewichtskontaktwinkels	14
2.2	Schematische Darstellung der verschiedenen Benetzungsszenarien .	15
2.3	Ausbildung des Precursorfilms	17
2.4	Tropfenprofile, aufgenommen mit orts aufgelöster Ellipsometrie . .	21
2.5	Elektronendichteverteilung	23
2.6	Molekulardynamiksimulation eines dünnen TEHOS-Films	24
2.7	Zeitentwicklung der Wahrscheinlichkeitsdichte	26
2.8	Energieniveauschema eines Farbstoffmoleküls	31
2.9	Illustration des idealen optischen Systems	34
2.10	Airy-Funktion und Gaußsche Intensitätsverteilung	36
2.11	Aufbau eines konfokalen Mikroskops	39
2.12	Prinzipieller Aufbau einer TIR-Beleuchtung	41
2.13	Organisation eines CCD-Chips	43
2.14	Beispiel für den Verlauf von Zeitreihen der Fluoreszenzintensität .	47
2.15	Streuung des MSD	51
3.1	Beispiele für Trajektorien aus den Computersimulationen	56
3.2	MSD für einige Trajektorien	57
3.3	Verlauf der Streuung für unterschiedliche Werte der Trajektorienlänge	58
3.4	Verlauf der Gewichtsfunktion für unterschiedliche Werte der Trajektorienlänge	59
3.5	Ergebnisse der gewichteten und ungewichteten linearen Regression	60
3.6	Verteilung der Diffusionskonstanten	61
3.7	Bedingte Wahrscheinlichkeitsverteilung für einen zweidimensionalen Diffusionsprozess	62

3.8	Faltung der Wahrscheinlichkeitsdichte mit Gaußfunktionen	63
3.9	Form der beugungsverbreiterten Spots von einzelnen simulierten Trajektorien	64
3.10	Verteilung der Spotgröße	66
3.11	Zeitabhängigkeit der mittleren Spotgröße	67
3.12	Aus den Spotgrößen berechnete Verteilung der Diffusionskonstanten	68
3.13	Verteilung der aus den Spotgrößen ermittelten Diffusionskonstan- ten nach Mittelung	69
4.1	Strahlengang und optische Komponenten des konfokalen Mikroskops	73
4.2	Aufbau des Weitfeldmikroskops	75
4.3	Gemessene Verstärkung der detektierten Intensität in Abhängig- keit vom Gain-Parameter der Kamera	77
4.4	Streuung bei der Bestimmung der Position immobiler Latexkügel- chen	79
4.5	Beispiele für die Abbildung von Tropfenprofilen	81
4.6	Strukturformeln der verwendeten Flüssigkeiten und Farbstoffe . .	83
4.7	Konfokalmikroskopische Aufnahme vom Rand eines TEHOS-Tropfens	85
4.8	Konfokalmikroskopische Aufnahme eines farbstoffdotierten PDMS- Tropfens	86
4.9	Bestimmung der Filmdicke mittels SPR (FQ-17)	87
4.10	Bestimmung der Filmdicke mittels SPR (FQ-3)	88
4.11	Zur Wahl der Intensitätsschwelle für die Fluoreszenzburstanalyse .	91
4.12	Vergleich der Burstlängenstatistiken aus Computersimulationen .	93
4.13	Schritte der Bildverarbeitung	95
5.1	Ergebnisse der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	102
5.2	An verschiedenen Positionen gemessene Burstlängenstatistiken . .	103
6.1	Momentaufnahmen der Fluoreszenz aus unterschiedlichen Berei- chen am Rand eines mit R6G dotierten TEHOS-Tropfens	109
6.2	Bilderserie von einem diffundierenden Molekül	110
6.3	Summation der Einzelbilder einer Bildserie	111
6.4	Intensität und relative quadratische Entfernung entlang der Tra- jektorie eines diffundierenden Moleküls	113
6.5	Verteilungsfunktion der Attachmentdauer	115

6.6	Mittlere quadratische Verschiebung für verschiedene Trajektorien	116
6.7	Verteilung der Diffusionskoeffizienten für verschiedene Proben . .	117
6.8	Momentaufnahme von einem diffundierenden und einem immobi- lisierten Molekül	120
6.9	Verteilung der Spotgrößen diffundierender und immobilisierter Moleküle	121
6.10	Mittlere Spotgrößen in Abhängigkeit von der Belichtungszeit . . .	122
6.11	Verteilung der mittels Spotgrößenanalyse ermittelten Diffusions- konstanten	123
6.12	Vergleich der Ergebnisse der Spotgrößenanalyse nach Mittelung .	125
6.13	Verteilungen der aus der Spotgrößenanalyse und der MSD-Analyse ermittelten Diffusionskonstanten	126
6.14	Verteilung der Attachmentdauer	127
6.15	Verteilungsfunktion der Perioden zwischen zwei Attachments . . .	128
6.16	Intensitätsabhängigkeit der Ergebnisse der Spotgrößenanalyse . .	130
6.17	Vergleich von Experiment und Fehlerfunktion (SSA)	131
6.18	Vergleich von Experiment und Fehlerfunktionen der MSD-Analyse	132
6.19	Histogramme der Diffusionskoeffizienten für unterschiedliche Tra- jektorienlängen	133
6.20	Zeitreihen der Spotgröße (konstante Werte)	135
6.21	Zeitreihen der Spotgröße (Sprünge)	136
6.22	Analyse der Perioden unterschiedlicher Spotgröße	137
6.23	Zeitreihen der Spotgröße (Attachments)	138
6.24	Trajektorien aus MD-Simulationen	140
6.25	Ergebnisse der MD-Simulationen	141
6.26	Potentialverlauf aus Molekulardynamiksimulationen	142
6.27	Zeitreihen der Intensität und der Spotgröße	144
6.28	Verteilung der Spitzenintensität der Spots	145
6.29	Polarisationsaufgelöste Abbildung	146

Literaturverzeichnis

- [1] SANTOS, F. D. D. ; ONDARCUHU, Th.: Free-Running Droplets. In: *Phys. Rev. Lett.* 75 (1995), S. 2972–2975
- [2] GALLARDO, B. ; GUPTA, V. ; EAGERTON, F. D. ; JONG, L. I. ; CRAIG, V. S. ; SHAH, R. R. ; ABBOTT, N. L.: Electrochemical Principles for Active Control of Liquids on Submillimeter Scale. In: *Science* 283 (1999), S. 57–60
- [3] GAU, H. ; HERMINGHAUS, S. ; LENZ, P. ; LIPOWSKY, R.: Liquid Morphologies on Structured Surfaces: From Microchannels to Microchips. In: *Science* 283 (1999), S. 46–49
- [4] KATAOKA, D. E. ; TROLAN, S. M.: Patterning liquid flow on the microscopic scale. In: *Nature* 402 (1999), S. 794–797
- [5] GLEICHE, M. ; CHI, L. F. ; FUCHS, H.: Nanoscopic channel lattices with controlled anisotropic wetting. In: *Nature* 403 (2000), S. 173–175
- [6] LEE, S.-W. ; LAIBINIS, P. E.: Directed Movement of Liquids on Patterned Surfaces Using Noncovalent Molecular Adsorption. In: *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000), S. 5395–5396
- [7] ICHIMURA, K. ; OH, S.-K. ; NAKAGAWA, M.: Light-Driven Motion of Liquids on a Photoresponsive Surface. In: *Science* 288 (2000), S. 1624–1626
- [8] DANIEL, S. ; CHAUDHURY, M. K. ; CHEN, J. C.: Fast Drop Movements Resulting from the Phase Change on a Gradient Surface. In: *Science* 291 (2001), S. 633–636

-
- [9] HEUBERGER, M. ; ZAECH, M. ; SPENCER, N. D.: Density Fluctuations Under Confinement: When is a Fluid Not a Fluid? In: *Science* 292 (2001), S. 905–908
- [10] CIEPLAK, M. ; SMITH, E. D. ; ROBBINS, M. O.: Molecular Origin of Friction: The Force on Adsorbed Layers. In: *Science* 265 (1994), S. 1209–1212
- [11] YU, C.-J. ; RICHTER, A. G. ; DATTA, A. ; DURBIN, M. K. ; DUTTA, P.: Observation of Molecular Layering in Thin Liquid Films Using X-Ray Reflectivity. In: *Phys. Rev. Lett.* 82 (1999), S. 2326–2329
- [12] EVMENENKO, G. ; DUGAN, S. W. ; KMETKO, J. ; DUTTA, P.: Molecular Ordering in Thin Liquid Films of Polydimethylsiloxanes. In: *Langmuir* (2001)
- [13] FORCADA, M. L. ; MATE, M.: Molecular layering during the evaporation of ultrathin liquid films. In: *Nature* 363 (1993), S. 527–529
- [14] GAO, J. ; LUEDTKE, W. D. ; LANDMAN, U.: Origins of Solvation Forces in Confined Films. In: *J. Phys. Chem. B* 101 (1997), S. 4013–4023
- [15] CICHOS, F.: *Molekuldynamiksimulationen dünner Flüssigkeitsfilme. – unveröffentlichte Ergebnisse*
- [16] HESLOT, F. ; FRAYSSE, N. ; CAZABAT, A. M.: Molecular layering in the spreading of wetting liquid drops. In: *Nature* 338 (1989), S. 640–642
- [17] LEGER, L. ; JOANNY, J. F.: Liquid Spreading. In: *Rep. Progr. Phys.* 1992 (1992), S. 431–487
- [18] DE GENNES, P.-G. ; CAZABAT, A. M.: Etallement d’une goutte stratifiée incompressible. In: *C. R. Acad. Sci. Paris* 310 (1990), S. 1601–1606
- [19] BURLATSKY, S. F. ; OSHANIN, G. ; CAZABAT, A. M. ; MOREAU, M.: Microscopic Model of Upward Creep of an Ultrathin Wetting Film. In: *Phys. Rev. Lett.* 76 (1996), S. 86–89

-
- [20] FRAYSSE, N. ; VALIGNAT, M. P. ; CAZABAT, A. M. ; HESLOT, F. ; LEVINSON, A. P.: The Spreading of Layered Microdroplets. In: *J. Coll. Interf. Science* 158 (1993), S. 27–32
- [21] BASCHE, T. (Hrsg.) ; MOERNER, W. E. (Hrsg.) ; ORRIT, M. (Hrsg.) ; WILD, U. P. (Hrsg.): *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*. 1. Weinheim : VCH, 1996
- [22] MOERNER, W. E. ; ORRIT, M. ; WEISS, S. ; GIMZEWSKI, J. K. ; JOACHIM, C. ; MEHTA, A. D.: Single Molecules. In: *Science* 283 (1999), S. 1667–1695
- [23] AMBROSE, W. P. ; JETT, P. M. Goodwin J. H. ; ORDEN, A. V. ; WERNER, J. H. ; KELLER, R. A.: Single Molecule Fluorescence Spectroscopy at Ambient Temperature. In: *Chem. Rev.* 99 (1999), S. 2919–2956
- [24] VANDEN BOUT, D. A. ; YIP, W.-T. ; HU, D. ; FU, D.-K. ; SWAGER, T. M. ; BARBARA, P. F.: Discrete Intensity Jumps and Intramolecular Electronic Energy Transfer in the Spectroscopy of Single Conjugated Polymer Molecules. In: *Science* 277 (1997), S. 1074–1077
- [25] DICKSON, R. M. ; CUBITTE, A. B. ; TSIEN, R. Y. ; MOERNER, W. E.: On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent proteins. In: *Nature* 388 (1997), S. 355–358
- [26] BASCHÉ, Th. ; MOERNER, W. E.: Photon Antibunching in the Fluorescence of a Single Dye Molecule Trapped in a Solid. In: *Phys. Rev. Lett.* 69 (1992), S. 1516–1519
- [27] BERNARD, J. ; FLEURY, L. ; TALON, H. ; ORRIT, M.: Photon bunching in the fluorescence from single molecules: A probe for intersystem crossing. In: *J. Chem. Phys.* 98 (1993), S. 850–859
- [28] BASCHÉ, Th. ; KUMMER, S. ; BRÄUCHLE, C.: Direct spectroscopic observation of quantum jumps of a single molecule. In: *Nature* 373 (1995), S. 132–134
- [29] PERKINS, Th. T. ; SMITH, D. E. ; CHU, S.: Direct Observation of Tube-Like Motion of a Single Polymer Chain. In: *Science* 264 (1994), S. 819–822

- [30] RIGLER, R. ; METS, Ü. ; WIDENGREN, J. ; KASK, P.: Fluorescence Correlation Spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. In: *Eur. Biophys. J.* 22 (1993), S. 169–175
- [31] KO, D.-S. ; SAUER, M. ; NORD, S. ; MUELLER, R. ; WOLFRUM, J.: Determination of the diffusion coefficient of a dye in a solution at single molecule level. In: *Chem. Phys. Lett.* 269 (1997), S. 54–58
- [32] SCHMIDT, T. ; SCHÜTZ, G. ; BAUMGARTNER, W. ; GRUBER, H. ; SCHINDLER, H.: Characterization of Photophysics and Mobility of Single Molecules in a Fluid Lipid Membrane. In: *J. Phys. Chem.* 99 (1995), S. 17662–17668
- [33] FUNATSU, T. ; HARADA, Y. ; TOKUNAGA, M. ; SAITO, K. ; YANAGIDA, T.: Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. In: *Nature* 374 (1995), S. 555–559
- [34] SCHWILLE, P. ; KORLACH, J. ; WEBB, W. W.: Fluorescence Correlation Spectroscopy With Single-Molecule Sensitivity on Cell and Model Membranes. In: *Cytometry* 36 (1999), S. 176–182
- [35] SCHÜTZ, G. J. ; SCHINDLER, H. ; SCHMIDT, Th.: Single-Molecule Microscopy on Model Membranes Reveals Anomalous Diffusion. In: *Biophys. J.* 73 (1997), S. 1073–1080
- [36] SCHÜTZ, G. J. ; KADA, G. ; PASTUSHENKO, V. P. ; SCHINDLER, H. G.: Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. In: *EMBO J.* 19 (2000), S. 892–901
- [37] ISHII, Y. ; YANAGIDA, T.: Single Molecule Detection in Life Science. In: *Single Molecules* 1 (2000), S. 5–13
- [38] SCHMIDT, T. ; SCHÜTZ, G. ; BAUMGARTNER, W. ; GRUBER, H. ; SCHINDLER, H.: Imaging of Single Molecule Diffusion. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), S. 2926–2929
- [39] XU, X.-H. ; YEUNG, E. S.: Direct Measurement of Single-Molecule Diffusion and Photodecomposition in Free Solution. In: *Science* 275 (1997), S. 1106–1109

-
- [40] DE GENNES, P.-G.: Wetting: statics and dynamics. In: *Rev. Mod. Phys.* 57 (1985), S. 827–863
- [41] AUSSERÉ, D. ; PICARD, A. M. ; LÉGER, L.: Existence and Role of the Precursor Film in the Spreading of Polymer Liquids. In: *Phys. Rev. Lett.* 57 (1986), S. 2671–2674
- [42] TANNER, L. H.: The Spreading of Silicone Oil Drops on Horizontal Surfaces. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 12 (1979), S. 1473–1484
- [43] VOUE, M. ; VALIGNAT, M. P. ; OSHANIN, G. ; CAZABAT, A. M. ; CONINCK, J. D.: Dynamics of Spreading of Liquid Microdroplets on Substrates of Increasing Surface Energies. In: *Langmuir* 14 (1998), S. 5951–5958
- [44] STOEBE, T. ; LIN, Z. ; HILL, R. M. ; WARD, M. D. ; DAVIS, H. T.: Surfactant-Enhanced Spreading. In: *Langmuir* 12 (1996), S. 337–344
- [45] HARDY, W. B.: The Spreading of Fluids on Glass. In: *Philosophical Mag.* 38 (1919), S. 49–55
- [46] VOUE, M. ; SEMAL, S. ; CONINCK, J. D.: Dynamics of Spreading on Heterogeneous Substrates in a Complete Wetting Regime. In: *Langmuir* 15 (1999), S. 7855–7862
- [47] LEGER, L. ; ERMAN, M. ; GUINET-PICARD, A. M. ; AUSSERE, D. ; STRAZIELLE, C.: Precursor Film Profiles of Spreading Liquid Droplets. In: *Phys. Rev. Lett.* 60 (1988), S. 2390–2393
- [48] SILBERZAN, P. ; LÉGER, L.: Evidence for a New Spreading Regime between Partial and Total Wetting. In: *Phys. Rev. Lett.* 66 (1991), S. 185–188
- [49] VALIGNAT, M. P. ; OSHANIN, G. ; VILETTE, S. ; CAZABAT, A.M. ; MOREAU, M.: Molecular Weight Dependence of Spreading Rates of Ultrathin Polymeric Films. In: *Phys. Rev. Lett.* 80 (1998), S. 5377–5380
- [50] DAILLANT, J. ; BENATTAR, J. J. ; LEGER, L.: Ultrathin films in wetting evidenced by x-ray reflectivity. In: *Phys. Rev. A.* 41 (1990), S. 1963–1977

- [51] ALBRECHT, U. ; OTTO, A. ; LEIDERER, P.: Two-Dimensional Liquid Polymer Diffusion: Experiment and Simulation. In: *Phys. Rev. Lett.* 68 (1992), S. 3192–3195
- [52] VILETTE, S. ; VALIGNAT, M. P. ; CAZABAT, A. M. ; JULLIEN, L. ; TIBERG, F.: Wetting on the Molecular Scale and the Role of Water. A Case Study of Wetting of Hydrophilic Silica Surfaces. In: *Langmuir* 12 (1996), S. 825–830
- [53] XU, L. ; SALMERON, M. ; BARDON, S.: Wetting and Molecular Orientation of 8CB on Silicon Substrates. In: *Phys. Rev. Lett.* 84 (2000), S. 1519–1522
- [54] HESLOT, F. ; CAZABAT, A. M. ; LEVINSON, P.: Dynamics of Wetting of Tiny Drops: Ellipsometric Study of the Late State of Spreading. In: *Phys. Rev. Lett.* 62 (1989), S. 1286–1289
- [55] BEKINK, S. ; KARABORNI, S. ; G.VERBIST ; ESSELINK, K.: Simulating the Spreading of a Drop in a Terraced Wetting Regime. In: *Phys. Rev. Lett.* 76 (1996), S. 3766–3769
- [56] CONINCK, J. D. ; D'ORTONA, U. ; KOPLIK, J. ; BANAVAR, J. R.: Terraced Spreading of Chain Molecules via Molecular Dynamics. In: *Phys. Rev. Lett.* 74 (1995), S. 928–931
- [57] CAZABAT, A. M. ; VALIGNAT, M. P. ; VILETTE, S. ; CONINCK, J. D. ; LOUCHE, F.: The Mechanism of Spreading: A Microscopic Description. In: *Langmuir* 13 (1997), S. 4754–4757
- [58] VOUE, M. ; CONINCK, J. D. ; VILETTE, S. ; VALIGNAT, M. P. ; CAZABAT, A. M.: Investigations of layered microdroplets using ellipsometric techniques. In: *Thin Solid Films* 313-314 (1998), S. 819–824
- [59] VOUE, M. ; VALIGNAT, M. P. ; OSHANIN, G. ; CAZABAT, A. M.: Dissipation Processes at the Mesoscopic and Molecular Scale. The Case of Polymer Films. In: *Langmuir* 15 (1999), S. 1522–1527
- [60] GAO, J. ; LUEDTKE, W. D. ; LANDMAN, U.: Friction Control in Thin-Film Lubrication. In: *J. Phys. Chem. B* 102 (1998), S. 5033–5037

-
- [61] KUMACHEVA, E. ; KLEIN, J.: Simple liquids confined to molecularly thin layers. II. Shear and frictional behavior of solidified films. In: *J. Chem. Phys.* 108 (1998), S. 7010–7022
- [62] PRINS, M. W. J. ; WELTERS, W. J. J. ; WEEKAMP, J. W.: Fluid Control in Multichannel Structures by Electrocapillary Pressure. In: *Science* 291 (2001), S. 277–280
- [63] ZHAO, B. ; MOORE, J. S. ; BEEBE, D. J.: Surface-Directed Liquid Flow Inside Microchannels. In: *Science* 291 (2001), S. 1023–1026
- [64] KLEIN, J. ; KUMACHEVA, E.: Confinement-Induced Phase Transitions in Simple Liquids. In: *Science* 269 (1995), S. 816–819
- [65] DEMIREL, A. L. ; GRANICK, S.: Glasslike Transition of a Confined Simple Fluid. In: *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996), S. 2261–2264
- [66] GAO, J. ; LUEDTKE, W. D. ; LANDMAN, U.: Layering Transitions and Dynamics of Confined Liquid Films. In: *Phys. Rev. Lett.* 79 (1997), S. 705–708
- [67] DOERR, A. K. ; M.TOLAN ; SEYDEL, T. ; PRESS, W.: The interface structure of thin liquid hexane films. In: *Physica B* 248 (1998), S. 263–268
- [68] YU, C.-J. ; RICHTER, A. G. ; KMETKO, J. ; DATTA, A. ; DUTTA, P.: X-ray diffraction evidence of ordering in a normal liquid near the solid interface. In: *Europhys. Lett.* 50 (2000), S. 487–493
- [69] FORREST, J. A. ; DALNOKI-VERESS, K. ; DUTCHER, J. R.: Interface and chain confinement effects on the glass transition temperature of thin polymer films. In: *Phys. Rev. E* 56 (1997), S. 5705–5716
- [70] DESCHENES, L. A. ; VANDEN BOUT, D. A.: Single-Molecule Studies of Heterogeneous Dynamics in Polymer Melts Near the Glass Transition. In: *Nature* 292 (2001), S. 255–258
- [71] MOERNER, W.E. ; KADOR, L.: Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid. In: *Phys. Rev. Lett.* 62 (1989), S. 2535–2538

- [72] ORRIT, M. ; BERNARD, J.: Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in a p-Terphenyl Crystal. In: *Phys. Rev. Lett.* 65 (1990), S. 2716–2718
- [73] NGUYEN, D. C. ; KELLER, R. A. ; JETT, J. H. ; MARTIN, J. C.: Detection of Single Molecules of Phycoerythrin in Hydrodynamically Focused Flows by Laser-Induced Fluorescence. In: *Anal. Chem.* 59 (1987), S. 2158–2161
- [74] SHERA, E. B. ; SEITZINGER, N. K. ; DAVIS, L. M. ; KELLER, R. A. ; SOPER, S. A.: Detection of Single Fluorescent Molecules. In: *Chem. Phys. Lett.* 174 (1990), S. 553–557
- [75] DUNN, R. C. ; HOLTOM, G. R. ; METS, L. ; XIE, X. S.: Near-Field Fluorescence Imaging and Fluorescence Lifetime Measurements of Light Harvesting Complexes in Intact Photosynthetic Membranes. In: *J. Phys. Chem.* 98 (1994), S. 3094–3098
- [76] GRUBER, A. ; DRÄBENSTEDT, A. ; TIETZ, C. ; FLEURY, L. ; WRACHTRUP, J. ; VON BORCZYSKOWSKI, C.: Scanning Confocal Optical Microscopy and Magnetic Resonance on Single Defect Centers. In: *Science* 276 (1997), S. 2012–2014
- [77] NIRMAL, M. ; DABBOUSI, B. ; BAWENDI, M. G. ; MACKLIN, J. J. ; TRAUTMAN, J. K. ; HARRIS, T. ; BRUS, L. E.: Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals. In: *Nature* 383 (1996), S. 802–804
- [78] EMPEDOCLES, S. A. ; NORRIS, D. J. ; BAWENDI, M. G.: Photoluminescence Spectroscopy of Single CdSe Nanocrystallite Quantum Dots. In: *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996), S. 3873–3876
- [79] CHAN, W. C. ; NIE, Sh.: Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. In: *Science* 281 (1998), S. 2016–2018
- [80] AMBROSE, W. P. ; BASCHÉ, Th. ; MOERNER, W. E.: Detection and spectroscopy of single molecules in a p-terphenyl crystal by means of fluorescence excitation. In: *J. Chem. Phys.* 95 (1991), S. 7150–7163

-
- [81] KOEHLER, J. ; DISSELHORST, J.A. ; DONCKERS, M.C. ; GROENEN, E.J. ; SCHMIDT, J. ; MOERNER, W.E.: Magnetic Resonance of a Single Molecular Spin. In: *Nature* 363 (1993), S. 242–243
- [82] WRACHTRUP, J. ; VON BORCZYSKOWSKI, C. ; BERNARD, J. ; ORRIT, M. ; BROWN, R.: Optical detection of magnetic resonance in a single molecule. In: *Nature* 363 (1993), S. 244–245
- [83] BETZIG, E. ; CICHESTER, R. J.: Single Molecules Observed by Near-Field Scanning Optical Microscopy. In: *Science* 262 (1993), S. 1422–1425
- [84] AMBROSE, W. P. ; GOODWIN, P. M. ; MARTIN, J. C. ; KELLER, R. A.: Single Molecule Detection and Photochemistry on a Surface Using Near-Field Optical Excitation. In: *Phys. Rev. Lett.* 72 (1994), S. 160–164
- [85] BIAN, R. X. ; DUNN, R. C. ; XIE, X. S.: Single Molecule Emission Characteristics in Near-Field Microscopy. In: *Phys. Rev. Lett.* 75 (1995), S. 4772–4775
- [86] RUITER, A. G. T. ; VEERMAN, J. A. ; GARCIA-PARAJO, M. F. ; VAN HULST, N. F.: Single Molecule Rotational and Translational Diffusion Observed by Near-Field Scanning Optical Microscopy. In: *J. Phys. Chem. A* 101 (1997), S. 7318–7322
- [87] MACKLIN, J. J. ; TRAUTMAN, J. K. ; HARRIS, T. D. ; BRUS, L. E.: Imaging and Time-Resolved Spectroscopy of Single Molecules at an Interface. In: *Science* 272 (1996), S. 255–258
- [88] HA, T. ; ENDERLE, Th. ; CHEMLA, D. S. ; SELVIN, P. R. ; WEISS, S.: Single Molecule Dynamics Studied by Polarization Modulation. In: *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996), S. 3979–3982
- [89] LU, H. P. ; XIE, X. S.: Single-molecule spectral fluctuations at room temperature. In: *Nature* 385 (1997), S. 143–146
- [90] SCHUSTER, J.: *Untersuchungen zur Fluoreszenzdetektion mittels optischer Nahfeldmikroskopie und konfokaler optischer Mikroskopie*, Technische Universität Chemnitz, Diplomarbeit, 1997

- [91] VALE, R. D. ; FUNATSU, T. ; PIERCE, D. W. ; ROMBERG, L. ; HARADA, Y. ; YANAGIDA, T.: Direct Observation of single kinesin molecules moving along microtubulus. In: *Nature* 380 (1996), S. 451–453
- [92] SONNLEITNER, A. ; SCHÜTZ, G. J. ; SCHMIDT, Th.: Free Brownian Motion of Individual Lipid Molecules in Biomembranes. In: *Biophys. J.* 77 (1999), S. 2638–2642
- [93] HARMS, G. S. ; SONNLEITNER, M. ; SCHÜTZ, G. J. ; SCHMIDT, Th.: Single-Molecule Anisotropy Imaging. In: *Biophys. J.* 77 (1999), S. 2864–2870
- [94] KE, P. C. ; NAUMANN, C. A.: Single Molecule Fluorescence Imaging of Phospholipid Monolayers at the Air Water Interface. In: *Langmuir* 17 (2001), S. 3727–3733
- [95] KUBITSCHECK, U. ; KUECKMANN, O. ; KUES, Th. ; PETERS, R.: Imaging and Tracking of Single GFP Molecules in Solution. In: *Biophys. J.* 78 (2000), S. 2170–2179
- [96] DICKSON, R. M. ; NORRIS, D.J. ; TZENG, Y.-L. ; MOERNER, W.E.: Three-Dimensional Imaging of Single Molecules Solvated in Pores of Poly(acrylamide) Gels. In: *Science* 274 (1996), S. 966–969
- [97] NIE, S. ; EMORY, S. R.: Probing Single Molecules by Surface Enhanced Raman Scattering. In: *Science* 275 (1997), S. 1102–1106
- [98] COGNET, L. ; HARMS, G. S. ; BLAB, G. A. ; LOMMERSE, P. H. M. ; SCHMIDT, Th.: Simultaneous dual-color and dual-polarization imaging of single molecules. In: *Appl. Phys. Lett.* 77 (2000), S. 4052–4054
- [99] TAMARAT, Ph. ; MAALI, A. ; LOUNIS, B. ; ORRIT, M.: Ten Years of Single-Molecule Spectroscopy. In: *J. Phys. Chem. A* 104 (2000), S. 1–16
- [100] ENGLISH, D. S. ; FURUBE, A. ; BARBARA, P. F.: Single-molecule spectroscopy in oxygen-depleted polymer films. In: *Chem. Phys. Lett.* 324 (2000), S. 15–19
- [101] WEBB, R. H.: Confocal Microscopy. In: *Rep. Progr. Phys.* 59 (1996), S. 427–471

-
- [102] PAWLEY, J. (Hrsg.): *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 2. New York : Plenum Press, 1995
- [103] ENTWICKLUNGSABTEILUNG CARL ZEISS JENA. *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie*
- [104] ENDERLEIN, J. ; RUCKSTUHL, Th. ; SEEGER, S.: Highly efficient optical detection of surface generated fluorescence. In: *Appl. Optics* 38 (1999), S. 724–732
- [105] ENDERLEIN, J.: Fluorescence detection of single molecules near a solution/glass interface - an electrodynamic analysis. In: *Chem. Phys. Lett.* 308 (1999), S. 263–266
- [106] ENDERLEIN, J.: New Approach to Fluorescence of Individual Molecules on Surfaces. In: *Phys. Rev. Lett.* 83 (1999), S. 3804–3807
- [107] ENDERLEIN, J.: Theoretical study of detection of a dipole emitter through an objective with high numerical aperture. In: *Optics Lett.* 25 (2000), S. 634–636
- [108] FUNATSU, T. ; HARADA, Y. ; HIGUCHI, H. ; TOKUNAGA, M. ; SAITO, K. ; ISHII, Y. ; VALE, R. D. ; YANAGIDA, T.: Imaging and nano-manipulation of single biomolecules. In: *Biophys. Chem.* 68 (1997), S. 63–72
- [109] ARAGON, S. R. ; PECORA, R.: Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics. In: *Journal of Chem. Phys.* 64 (1976), S. 1791–1803
- [110] WIDENGREN, J. ; METS, Ü. ; RIGLER, R.: Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A Theoretical and Experimental Study. In: *J. Phys. Chem.* 99 (1995), S. 13368–13379
- [111] EDMAN, L.: Theory of Fluorescence Correlation Spectroscopy on Single Molecules. In: *J. Phys. Chem. A* 104 (2000), S. 6165–6170
- [112] BOBROFF, N.: Position measurement with a resolution and noise limited instrument. In: *Rev. Sci. Instrum.* 57 (1986), S. 1152–1157

-
- [113] SAXTON, M. J.: Single-Particle Tracking: The Distribution of Diffusion Coefficients. In: *Biophys. J.* 72 (1997), S. 1744–1753
- [114] QIAN, H. ; SHEETZ, M. P. ; ELSON, E. L.: Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. In: *Biophys. J.* 60 (1991), S. 910–921
- [115] PRESS, W. H. ; TEUKOLSKY, S. A. ; VETTERLING, W. T. ; FLANNERY, B. P.: *Numerical Recipes*. 2. Cambridge : Cambridge University Press, 1992
- [116] LIDE, D. (Hrsg.): *Handbook of Chemistry and Physics*. 71. Boca Raton : CRC Press, 1990
- [117] Die AFM-Messungen wurden von Dr. Dietmar Vogel am Fraunhofer-Institut für Zuverlässigkeit und Mikrointegration in Berlin durchgeführt.
- [118] YU, C.-J.: *Observation of Molecular Layering in Liquids at Solid-Liquid Interfaces Using X-ray Reflectivity*. Evanston, Illinois, Northwestern University, Diss., 2000
- [119] Die mit Gold beschichteten Glassubstrate wurden von Herrn Dr. Kaufmann am Zentrum für Mikrotechnologien an der TU Chemnitz präpariert. Die Siliziumsubstrate wurden von Herrn Reinhard Müller vom Zentrum für Mikrotechnologien an der TU Chemnitz zur Verfügung gestellt.
- [120] RAETHER, H.: *Surface Plasmons*. 1. Berlin : Springer, 1988
- [121] Die SPR-Messungen wurden von Arne Schob (TU Chemnitz) durchgeführt.
- [122] SIEGEL, R. A. ; LANGER, R.: A New Monte Carlo Approach to Diffusion in Constricted Porous Geometries. In: *J. Coll. Int. Sci.* 109 (1986), S. 426
- [123] NIE, S. ; CHIU, D. T. ; ZARE, R. N.: Real-Time Detection of Single Molecules in Solution by Confocal Fluorescence Microscopy. In: *Anal. Chem.* 67 (1995), S. 2849–2857
- [124] CHIU, D. T. ; ZARE, R. N.: Biased Diffusion, Optical Trapping and Manipulation of Single Molecules in Solution. In: *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996), S. 6512–6513

-
- [125] OSBORNE, M. A. ; BALASUBRAMANIAN, S. ; FUREY, W. S. ; KLENERMAN, D.: Optically Biased Diffusion of Single Molecules Studied by Confocal Fluorescence Microscopy. In: *J. Phys. Chem. B* 102 (1998), S. 3160–3167
- [126] BURDEN, D. L. ; KASIANOWICZ, J. J.: Diffusion Bias and Photophysical Dynamics of Single Molecules in Unsupported Lipid Bilayer Membranes Probed with Confocal Microscopy. In: *J. Phys. Chem. B* 104 (2000), S. 6103–6107
- [127] ASHKIN, A.: Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1997), S. 4853–4860
- [128] JAEHNE, B.: *Digitale Bildverarbeitung*. 3. Berlin : Springer, 1993
- [129] WIRTH, M.J. ; SWINTON, D.J.: Single-Molecule Study of an Adsorbed Oligonucleotide Undergoing Both Lateral Diffusion and Strong Adsorption. In: *J. Phys. Chem. B* 105 (2001), S. 1472–1477
- [130] SCHUSTER, J. ; CICHOS, F. ; WRACHTRUP, J. ; VON BORCZYKOWSKI, C.: Diffusion of Single Molecules Close to Interfaces. In: *Single Molecules* 1 (2000), S. 299–305
- [131] SCHUSTER, J. ; CICHOS, F. ; VON BORCZYKOWSKI, C.: Observation of Single Molecule Diffusion in Micro- and Nanodroplets of Polymers on Surfaces. In: *Physics, Chemistry and Application of Nanostructures*, World Scientific, Singapore, 2001, S. 299–303
- [132] SCHUSTER, J. ; CICHOS, F. ; VON BORCZYKOWSKI, C.: *Diffusion measurements by Single Molecule Spot-Size Analysis*. – in Vorbereitung
- [133] SCHUSTER, J. ; CICHOS, F. ; VON BORCZYKOWSKI, C.: *Diffusion of Single Molecules in Thin Liquid Films*. – in Vorbereitung

Danksagung

Diese Arbeit entstand an der Professur „Optische Spektroskopie und Molekülphysik“ an der TU Chemnitz.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. C. von Borczyskowski, der mir die Arbeit an der Professur ermöglichte und der diese Arbeit mit vielen anregenden Diskussionen unterstützte.

Dr. Frank Cichos danke ich ebenfalls für die große Unterstützung und zahlreiche Anregungen. Die von ihm durchgeführten Molekulardynamiksimulationen haben die Interpretation der experimentellen Ergebnisse wesentlich vorangebracht.

Prof. Dr. Jörg Wrachtrup danke ich für die Unterstützung in der Anfangsphase der Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Professur dafür, dass sie für ein sehr angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben und die Arbeit in vielen Punkten unterstützt haben.

Besonders danke ich Rita Zeugfang für die Mitarbeit bei der Präparation der Proben sowie Dr. Kaufmann und Reinhard Müller vom Zentrum für Mikrotechnologien der TU Chemnitz für die Bereitstellung verschiedener Substrate. Arne Schob danke ich für die Durchführung der SPR-Messungen zur Bestimmung der Schichtdicke. Weiterhin danke ich Dr. Dietmar Vogel vom Fraunhofer-Institut für Zuverlässigkeit und Mikrointegration Berlin für die AFM-Messungen zur Bestimmung der Oberflächenrauigkeiten.

Mein Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die Teile der Arbeit im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Benetzung und Strukturbildung an Grenzflächen“ finanziell gefördert hat.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der im Literaturverzeichnis aufgeführten Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Jörg Schuster

Chemnitz, den 20. November 2001

Thesen

vorgelegt von Dipl.-Phys. Jörg Schuster

1. Die Spotgrößenanalyse erlaubt die Bestimmung von Diffusionskonstanten diffundierender Farbstoffmoleküle aus CCD-Aufnahmen der Fluoreszenz.
2. Die Spotgrößenanalyse weist gegenüber der Bestimmung von Diffusionskonstanten durch Berechnung der mittleren quadratischen Verschiebung eine deutlich verbesserte Genauigkeit auf.
3. Die Spotgrößenanalyse erlaubt die Detektion von Veränderungen der Diffusionskonstanten auf Zeitskalen, die in der Größenordnung der Belichtungszeit, die zur Bildaufnahme nötig ist, liegt.
4. Am Rand von partiell benetzenden Ethylenglykoltropfen auf Quarzoberflächen wird eine signifikante Verlangsamung der Diffusion von Molekülen des Farbstoffs Rhodamin 6G, verglichen mit der Diffusion im Tropfeninneren, beobachtet.
5. Es ist möglich, diffundierende Farbstoffmoleküle im Precursorfilm benetzender Tropfen und in ultradünnen Flüssigkeitsfilmen zu beobachten. Die Diffusionsbewegung einzelner diffundierender Moleküle kann dabei über mehrere Sekunden verfolgt werden.
6. Die Diffusion von Rhodamin 6G in ultradünnen TEHOS-Filmen weist eine ausgeprägte Anisotropie auf. Senkrecht zur Oberfläche ist die Beweglichkeit der Moleküle nahezu eingefroren.
7. In ultradünnen TEHOS-Filmen auf Quarzsubstraten bewegen sich die Farbstoffmoleküle vorzugsweise lateral, innerhalb von Schichten molekularer Dicke. Die Aufenthaltsdauer der Moleküle in einer Schicht liegt im Bereich von bis zu einigen 100 ms.

8. In ultradünnen TEHOS-Filmen auf Quarzsubstraten zeigt die Diffusionskonstante der Farbstoffmoleküle in Oberflächennähe eine lineare Abhängigkeit von der Entfernung zur festen Oberfläche, wobei die Diffusionskonstante mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche ebenfalls zunimmt. Die lineare Abstandsabhängigkeit der Diffusionskonstante wird durch einen Anstieg von $0.5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ charakterisiert.
9. Die Diffusion einzelner Farbstoffmoleküle in dünnen TEHOS-Filmen auf Quarzsubstraten wird durch Perioden unterbrochen, in denen sich die Position der Moleküle nicht ändert. Die Dauer dieser Perioden ist exponentialverteilt.
10. Es ist möglich, Informationen über die Struktur von Flüssigkeiten in der Nähe von Oberflächen durch die Analyse der Diffusionsprozesse von Farbstoffen in dünnen Flüssigkeitsfilmen zu erhalten.

Lebenslauf

Name:	Jörg Schuster
Geburtstag:	29. 09. 1969
Geburtsort:	Karl-Marx-Stadt (heute Chemnitz)
Sep. 76 - Juli 86	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule „Hanns Eisler“, Karl-Marx-Stadt
Sep. 86 - Juli 89	Berufsausbildung mit Abitur zum Elektromonteur, VEB Numerik „Karl Marx“, Karl-Marx-Stadt
Aug. 89 - Juni 91	Tätigkeit als Labortechniker im Bereich Erzeugnisentwicklung, VEB Numerik „Karl Marx“, Karl-Marx-Stadt
Nov. 89 - Sep. 90	Wehrdienst
Sep. 91 - Feb. 97	Studium der Physik, Technische Universität Chemnitz Abschluss: Diplomphysiker Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Fluoreszenzdetektion mittels optischer Nahfeldmikroskopie und konfokaler optischer Mikroskopie“
März 97 - jetzt	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Technische Universität Chemnitz